

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata

XXIV Ciclo

Curriculum in Fisiologia

**Potenzialità e controllo di colture di
diatomee marine per la produzione di
biomasse energetiche**

Tutor

Angelo Fontana

Dottoranda

Filomena Monica Vella

Anni accademici 2008/2011

Ai miei genitori e

a mio fratello

INDICE

ABBREVIAZIONI.....	6
ABSTARCT.....	7
CAPITOLO I: STATO DELL'ARTE.....	10
I.1. Il problema energetico e le fonti rinnovabili.....	10
I.2. Il biodiesel da microalghe.....	16
I.3. Le diatomee.....	19
I.4. Dalle colture microalgali alla produzione di biodiesel.....	28
I.4.1. Le colture microalgali.....	28
I.4.2. I fotobioreattori.....	30
I.4.3. La produzione mondiale di biocarburanti da microalghe.....	36
I.4.4. Raccolta della biomassa.....	38
I.4.5. I biocarburanti da biomasse.....	40
CAPITOLO II: SCREENING DELLE MICROALGHE.....	46
II.1. Introduzione.....	46
II.2. Materiali e metodi.....	48
II.2.1. Condizioni di crescita delle microalghe.....	48

II.2.2. Parametri controllati durante le crescite microalgali.....	51
II.2.3. Tempi di duplicazione.....	52
II.2.4. Determinazione del contenuto proteico.....	52
II.2.5. Determinazione del contenuto di carboidrati.....	53
II.2.6. Determinazione del contenuto lipidico totale.....	54
II.2.7. Analisi qualitativa e quantitativa dell'estratto lipidico totale...	55
II.2.8. Determinazione della composizione lipidica.....	57
II.2.9. Analisi della composizione degli acidi grassi.....	57
II.3. Risultati e discussione.....	58
II.3.1. Tempi di duplicazione e curve di crescita.....	58
II.3.2. Produttività in termini di biomassa e di lipidi.....	60
II.3.3. Composizione chimica percentuale delle microalghe.....	63
II.3.4. Composizione lipidica.....	65
II.3.5. Composizione degli acidi grassi totali.....	69
II.3.6. Parametri tecnici delle crescite microalgali.....	71
II.3.7. Analisi statistica multivariata.....	73
II.4. Conclusioni.....	77
 CAPITOLO III: CRESCITE INDOOR IN FOTOBIOREATTORI.....	 79
III.1. Introduzione.....	79
III.2. Materiali e metodi.....	80
III.2.1. Le microalghe selezionate.....	80
III.2.2. I fotobioreattori.....	80
III.2.3. Condizioni di crescita delle microalghe nei fotobioreattori.....	82

III.2.4. Preparazione degli inoculi per i fotobioreattori.....	84
III.2.5. Parametri controllati durante le crescite microalgali in fotobioreattore.....	84
III.2.6. Raccolta finale della biomassa.....	85
III.2.7. Tempi di duplicazione.....	86
III.3. Risultati e discussione.....	86
III.3.1. <i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369: curve di crescita e biomassa.....	87
III.3.2. <i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369: lipidi, proteine e carboidrati.....	89
III.3.3. <i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343: curve di crescita e biomassa.....	92
III.3.4. <i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343: lipidi, proteine e carboidrati.....	95
III.3.5. <i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331: curve di crescita e biomassa.....	98
III.3.6. <i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331: lipidi, proteine e carboidrati....	100
III.3.7. <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09: curve di crescita e biomassa.....	103
III.3.8. <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09: lipidi, proteine e carboidrati.....	107
III.4. Conclusioni.....	110
 CAPITOLO IV: CRESCITE OUTDOOR IN FOTOBIOREATTORE.....	 113
IV.1. Introduzione.....	113
IV.1.1. La luce.....	113
IV.1.2. La temperatura.....	115
IV.2. Materiali e metodi.....	116
IV.2.1. Il fotobioreattore esterno.....	116

IV.2.2. Condizioni di crescita nel fotobioreattore esterno.....	117
IV.2.3. Preparazione degli inoculi per il fotobioreattore esterno.....	119
IV.2.4. Parametri controllati in fotobioreattore esterno.....	119
IV.2.5. Raccolta finale della biomassa.....	120
IV.3. Risultati e discussione.....	121
IV.3.1. Curve di crescita e biomassa di <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09...	121
IV.3.2. Produttività in lipidi di <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09.....	124
IV.3.3. Caratteristiche del biodiesel di <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09....	126
IV.3.4. Produttività in proteine e carboidrati di <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09.....	127
IV.4. Conclusioni.....	129
 CAPITOLO V: CRESCITA IN DUE FASI.....	 132
V.1. Introduzione.....	132
V.1.1. I nutrienti.....	132
V.2. Materiali e metodi.....	133
V.2.1. Condizioni di crescita.....	133
V.2.2. Parametri controllati durante le crescite.....	135
V.3. Risultati e discussione.....	136
V.3.1. Curve di crescita e biomasse ottenute in seconda fase con <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09.....	136
V.3.2. Resa e produttività lipidica ottenuta in seconda fase con <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09.....	138
V.4. Conclusioni.....	139

CAPITOLO VI: CRESCITA IN PRESENZA DI GAS DI SCARICO.....	141
VI.1. Introduzione.....	141
VI.1.1. I gas di scarico.....	141
VI.2. Materiali e metodi.....	142
VI.2.1. Condizioni di crescita.....	142
VI.2.2. Parametri controllati durante le crescite.....	143
VI.3. Risultati e discussione.....	145
VI.3.1. Curve di crescita e biomasse ottenute con i gas di scarico con <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09.....	145
VI.3.2. Resa e produttività in lipidi, proteine e carboidrati ottenute con <i>Thalassiosira weissflogii</i> P09 in presenza di gas di scarico.....	147
VI.4. Conclusioni.....	149
 CAPITOLO VIII: CONCLUSIONI.....	 150
 BIBLIOGRAFIA.....	 152

ABBREVIAZIONI

<i>C. curvisetus</i>	<i>Chaetoceros curvisetus</i>
<i>C. socialis</i>	<i>Chaetoceros socialis</i>
<i>C. affinis</i>	<i>Chaetoceros affinis</i>
<i>T. rotula</i>	<i>Thalassiosira rotula</i>
<i>T. weissflogii</i>	<i>Thalassiosira weissflogii</i>
<i>T. pseudonana</i>	<i>Thalassiosira pseudonana</i>
<i>C. cryptica</i>	<i>Cyclotella cryptica</i>
<i>S. marinoi</i>	<i>Skeletonema marinoi</i>
<i>C. fusiformis</i>	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>
<i>P. pseudo delicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia pseudo delicatissima</i>
<i>D. brightwelli</i>	<i>Ditylum brightwelli</i>
<i>N. salina</i>	<i>Nannochloropsis salina</i>
<i>D. salina</i>	<i>Dunaliella salina</i>
<i>D. tertiolecta</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>

ABSTARCT

Le diatomee sono eucarioti unicellulari fotosintetici provvisti di una teca esterna di materiale siliceo. Questi protisti, erroneamente assimilati alle microalghe verdi, sono responsabili di improvvise e massive crescite, note come bloom, negli oceani e nei mari del pianeta. Il fenomeno, che rappresenta uno dei principali meccanismi attraverso cui avviene la fissazione del carbonio sulla terra, è alla base della catena trofica marina e contribuisce al sequestro di circa il 40% dell'anidride carbonica globale. Nonostante questo ruolo, i fattori fisiologici e biochimici che determinano l'inizio e la fine dei bloom sono poco noti. Tuttavia la capacità "fisiologica" di sviluppare biomasse è di grande interesse per la possibilità di un loro utilizzo come fonte di composti bioattivi e per la produzione di energia. In particolare, poiché i lipidi delle microalghe sono utilizzabili come succedanei del petrolio, questi organismi unicellulari sono oggetto da circa 15 anni di un'attiva ricerca per la selezione e crescita di specie per la produzione di biodiesel. Ne consegue che studi sui fattori chimico-fisici e metabolici che controllano la crescita delle microalghe, soprattutto nel caso delle diatomee, sono propedeutici per lo sviluppo di un sistema per la produzione di energia rinnovabile ed eco-compatibile.

In questa tesi dottorale è stato eseguito uno studio molto ampio che ha compreso la selezione delle specie, l'utilizzo di fotobioreattori di diversa geometria con tre specie modello (*Thalassiosira weissflogii*, *Cyclotella cryptica* e *Nannochloropsis salina*), la sperimentazione in

campo per un anno della crescita della diatomea *Thalassiosira weissflogii* e la resa energetica dei componenti della biomassa prodotta su circa venti differenti ceppi o strain. Durante questo lavoro, sono state anche messe a punto tecniche analitiche per la valutazione della produttività delle microalghe e, soprattutto, sono state osservate le variazioni delle crescite e dei componenti della biomassa in funzione di nutrienti, inibitori metabolici e parametrici chimico-fisici.

Complessivamente gli studi hanno messo in evidenza che, su ventuno microalghe, due specie di diatomee, *Thalassiosira weissflogii* e *Cyclotella cryptica*, e la microalga verde *Nannochloropsis salina* coniugano, in condizioni fisiologiche, una buona stabilità biologica con discreta produttività di biomassa (circa 30 mg/L/giorno) e buona produttività lipidica (vicino al 35% del peso secco per le due diatomee). Successivi studi su fotobioreattori da 60 L hanno confermato questi dati, indicando che specialmente la *Thalassiosira weissflogii* offre una serie di vantaggi tecnologici (velocità di sedimentazione, resistenza a contaminazione biologica, tolleranza a condizioni estreme di temperatura e di luce) e biologici (efficiente assorbimento di anidride carbonica, assenza di fotoinibizione, produzione di polisaccaridi solubili, alti livelli di trigliceridi). La sperimentazione di questa microalga in campo per un anno (Settembre 2009 – Luglio 2010) ha consentito di ottenere una produzione lipidica media giornaliera di circa 10 mg/L/giorno, che potenzialmente corrisponde a più di 6 tonnellate di biodiesel per ettaro/anno. Sono stati effettuati anche studi riguardo il comportamento della microalga ad alte concentrazioni di gas clima-alteranti, valutando il loro effetto sulla fisiologia e sul metabolismo dei tre ceppi algali selezionati per questo

lavoro di tesi dottorale. Le microalghe si sono dimostrate molto tolleranti ed in grado di assorbire grandi quantità dei gas. Per quello che sappiamo, è il primo studio di questo tipo fatto in Italia con una diatomea di tipo centrico. I risultati dei dati rappresentano una base importante per successivi studi in campo con prototipi pre-industriali.

CAPITOLO I

STATO DELL'ARTE

I.1. Il problema energetico e le fonti rinnovabili

Dalla metà del XIX secolo, con l'avvento dell'era industriale, si è registrato un continuo incremento della domanda mondiale di energia, che, secondo le previsioni più attendibili nel 2050 triplicherà ulteriormente rispetto ai valori attuali già elevati. Ciò è dovuto:

- ☞ al generale incremento della popolazione mondiale;
- ☞ all'aumento della popolazione che vive nei centri urbani dove si consuma più energia elettrica;
- ☞ al notevole incremento delle richieste di energia da parte dei Paesi in via di sviluppo, quali la Cina o l'India, che sono molto popolosi e stanno cercando di raggiungere gli standard economici e la qualità della vita dei Paesi occidentali.

La situazione impone all'attenzione del mondo politico e scientifico il problema di garantire l'approvvigionamento di energia nel lungo periodo e la necessità di far fronte sia all'esaurimento del petrolio sia ai problemi ambientali derivanti dall'utilizzo dei combustibili fossili. Il fabbisogno energetico del pianeta attualmente dipende quasi completamente (85%) dall'utilizzo di combustibili fossili, quali carbone, petrolio e gas naturale (Energy Needs, Choices and Possibilities. Scenarios to 2050. Shell International, 2001).

Il consumo di queste materie è anche la causa di sconvolgimenti ambientali come le piogge acide e l'inquinamento dell'aria dovuto ai gas di scarico (a livello locale) e l'effetto serra (a livello globale). Per tale motivo la politica energetica degli ultimi anni ha enfatizzato il risparmio energetico e incentivato l'utilizzo delle fonti di energia rinnovabili non fossili. Sotto questa denominazione vanno quelle forme di energia generate da fonti che, per le loro caratteristiche intrinseche, si rigenerano o non sono "esauribili" nella scala dei tempi "umani" e, per estensione, il cui utilizzo non pregiudica le risorse naturali per le generazioni future. Rientrano nella categoria l'energia idroelettrica, marina, eolica, solare, geotermica, da biomassa e termovalorizzazione.

E' in questo contesto che si colloca il primo segno dell'inversione di tendenza nella politica internazionale in campo energetico sancito con la sottoscrizione del Protocollo di Kyoto nel 1997. L'accordo, firmato da quasi tutti i paesi del mondo, mirava a penalizzare le emissioni di gas serra, in particolare di CO₂, premiandone la mancata generazione. Nell'intenzione dei legislatori, il Protocollo di Kyoto doveva rappresentare il primo passo per la progressiva riduzione delle emissioni dei gas serra nell'atmosfera e per contrastare i cambiamenti climatici in atto che stanno determinando un aumento della temperatura terrestre con gravi rischi per la sopravvivenza di molte forme di vita.

Il Protocollo prevedeva di fatto un maggior utilizzo di energia proveniente da fonti rinnovabili a discapito dei combustibili tradizionali, incentivando lo sviluppo di nuove tecnologie a ridotto impatto ambientale e ad alta efficienza energetica. Purtroppo, per la

complessità dei processi coinvolti e degli impegni previsti, nonché per ragioni politiche, molti degli obiettivi previsti nel Protocollo non sono stati ancora realizzati.

Anche altre conferenze mondiali sull'ambiente tenutesi negli anni successivi non hanno permesso una svolta nettamente positiva sulla questione mettendo solo in evidenza che spesso gli interessi economici e di parte hanno prevalso sulla ricerca del benessere e della salute del pianeta e di tutti i suoi abitanti. Il risultato è che ancora oggi le emissioni nocive per l'uomo e l'ambiente restano a livelli allarmanti.

Nel 2001 le fonti energetiche rinnovabili coprivano a livello mondiale il 13% dell'offerta totale di energia primaria. La quota delle fonti rinnovabili era quasi doppia rispetto a quella dell'energia nucleare, ma enormemente inferiore rispetto a quella delle fonti fossili (petrolio 35%, combustibili solidi 24% e gas naturale 21%) (Figura I.1) (IEA Renewables Information, 2003).

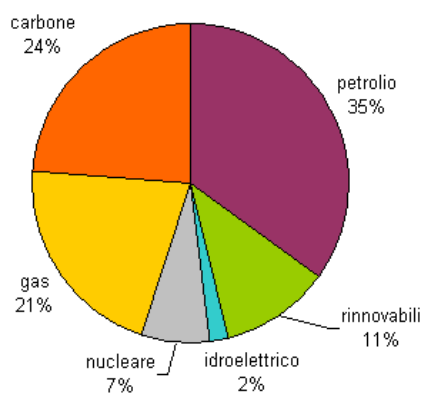


Figura I.1 - Contributo dei differenti tipi di energia al fabbisogno mondiale

Agli inizi del 2000, nella Comunità Europea i costi per la produzione di elettricità dalle fonti rinnovabili erano (Haas et al., 2000):

- ☞ 0.30-0.80 €/kWh per l'energia solare fotovoltaica;
- ☞ 0.04-0.25 €/kWh per l'energia idroelettrica;
- ☞ 0.07-0.19 €/kWh per l'energia da biomasse;
- ☞ 0.04-0.08 €/kWh per l'energia eolica.

Questi costi sono da confrontare con gli attuali prezzi per l'elettricità ricavata dalle convenzionali fonti fossili, che è compresa tra 0.03-0.05 €/kWh.

Per favorire l'uso delle energie rinnovabili, negli ultimi anni la Commissione Europea ha stabilito delle direttive per l'alleggerimento degli oneri amministrativi, il miglioramento della trasparenza e della diffusione delle informazioni, l'adeguamento e l'aumento del numero degli impianti e dei sistemi di interconnessione. Inoltre, la Commissione ha proposto misure di sostegno, di incentivo e stimolo a favore delle fonti energetiche rinnovabili, fra cui l'adozione di un sistema di sostegno ai biocarburanti, in particolare nel settore dei trasporti. La tabella di marcia fissata dall'Europa prevede un obiettivo generale obbligatorio pari ad una quota del 20% delle fonti energetiche rinnovabili nel consumo interno lordo entro il 2020. Per i biocarburanti, la Commissione intende fissare un obiettivo minimo del 10% entro il 2020, stimando che l'obiettivo del 20% permetterà riduzioni fino a 600 - 900 milioni di tonnellate di CO₂ all'anno. Tale obiettivo è accompagnato da una modifica della direttiva 98/70/CE relativa alla qualità dei carburanti e dei combustibili, per integrarvi la quota dei biocarburanti.

Ai fini della presente direttiva della Commissione Europea si intende per **biocarburante** un carburante liquido o gassoso ricavato da biomasse. In generale, si può dire che è **biomassa** tutto ciò che ha una matrice organica, con esclusione delle plastiche e dei materiali fossili.

La biomassa utilizzabile ai fini energetici comprende tutti quei materiali organici che possono essere utilizzati direttamente come combustibili ovvero trasformati in altre sostanze (solide, liquide o gassose) di più facile utilizzo negli impianti di conversione.

Tra i principali biocarburanti, ricordiamo:

- ☞ **bioetanolo**: un alcool ottenuto mediante il processo di fermentazione di diversi prodotti agricoli ricchi di carboidrati, quali i cereali (mais, sorgo, frumento, orzo) o le colture zuccherine (bietola e canna da zucchero). Nonostante l'elevato costo di produzione, pari a circa due - tre volte quello della benzina, il bioetanolo può risultare ancora fonte di profitto se si considerano le agevolazioni fiscali e i finanziamenti di origine governativa legati alla caratteristica "rinnovabile" di questa fonte energetica;
- ☞ **biodiesel**: miscela di esteri metilici di acidi grassi a catena lunga ricavata da un olio di origine vegetale o animale, destinato ad essere usato come biocarburante. L'uso di biodiesel non crea nessuna condizione negativa per il funzionamento e l'usura dei motori e le prestazioni risultano essere del tutto confrontabili con quelle ottenute con il gasolio tradizionale, consentendo resa ed affidabilità;

- ☞ **biogas:** gas combustibile ricavato dalla biomassa e/o dalla parte biodegradabile dei rifiuti, che può essere trattato in un impianto di purificazione onde ottenere una qualità analoga a quella del gas naturale, al fine di essere usato come biocarburante o gas da legna;
- ☞ **biometanolo:** metanolo ricavato dalla biomassa, destinato ad essere usato come biocarburante;
- ☞ **biodimetiletere:** etere dimetilico ricavato dalla biomassa, destinato ad essere usato come biocarburante;
- ☞ **bio-ETBE** (etil-terziario-butil-etere): carburante prodotto partendo da bioetanolo; la percentuale in volume di bio-ETBE calcolata come biocarburante è del 47%;
- ☞ **bio-MTBE** (metil-terziario-butil-etere): carburante prodotto partendo da biometanolo; la percentuale in volume di biocarburante nel bio-MTBE è del 36%;
- ☞ **biocarburanti sintetici:** idrocarburi sintetici, utilizzati puri o in miscele, prodotti a partire dalla biomassa;
- ☞ **bioidrogeno:** in realtà non è una fonte di energia, ma un vettore energetico, il che significa che deve essere prodotto da altre fonti, come l'acqua (mediante elettrolisi), petrolio (mediante lo steam-reforming) o biomasse (mediante gassificazione, fermentazione, ecc.). L'idrogeno, viste le sue caratteristiche, può essere considerato come il biocombustibile del futuro per le grandi prestazioni e i bassi tassi di inquinamento derivanti dal suo utilizzo;

- ☞ **bioolio:** olio prodotto da piante oleaginose mediante pressione, estrazione o processi analoghi, greggio o raffinato ma non modificato chimicamente. E' destinato alla combustione in motori diesel.

I.2. Il biodiesel da microalghe

Il biodiesel è un biocombustibile, cioè un combustibile ottenuto da fonti biologiche, come oli vegetali raffinati, che può essere utilizzato come combustibile alternativo al gasolio, al gas metano, al GPL e al carbone. E' costituito da miscele di esteri metilici di acidi grassi a lunga catena, generalmente acido stearico ed acido palmitico.

Attualmente la produzione di biodiesel si basa sulla conversione mediante una reazione di trans-esterificazione con metanolo di oli vegetali ottenuti da semi di soia (Bunyakiat et al., 2006), semi di colza (Peterson et al., 1996), frutti di palma (Al-Widyan et al., 2002) e da semi di girasole (Antolin et al., 2002) oppure dal riciclo di oli esausti (Bouaid et al., 2007). L'utilizzo di piante coltivate a terra però richiede notevoli superfici agricole da dedicare esclusivamente a colture energetiche, innescando problematiche di competitività con quelle da destinare a colture agroalimentari. I tempi di crescita e di produzione delle piante da dedicare alla produzione di biodiesel sono estremamente lunghi e difficilmente consentono di far fronte al tasso di consumo del biodiesel imposto dal settore dei trasporti.

Diversamente dalle piante coltivate a terra, le microalghe presentano caratteristiche tali da renderle una fonte di biocarburanti che, sul

medio periodo, potrà risultare competitiva rispetto al petrolio di origine fossile. Infatti, le maggiori velocità di crescita delle microalghe e il loro elevato contenuto in olio consentono, a parità di superfici occupate, produttività molto più elevate rispetto a quelle delle piante coltivate a terra (Verma et al., 2010). Le microalghe riescono a fare da 1 a 3 divisioni cellulari in un giorno, raddoppiando così la biomassa nel giro di 24 ore. A differenza delle piante terrestri, hanno un'elevata efficienza fotosintetica con circa il 3 - 8% dell'energia solare viene convertita in biomassa, mentre l'efficienza fotosintetica delle piante è pari circa allo 0.5% (Verma et al., 2010). Inoltre la coltivazione di microalghe può avvenire in zone non adatte a coltivazioni alimentari, zone aride o industriali, non sottraendo all'agricoltura superfici utili per prodotti destinati all'alimentazione (Hu et al., 2008).

Un altro vantaggio consiste nel fatto che, a seconda della tipologia di alga utilizzata, il residuo della biomassa, comunemente denominato torta residua, può contenere composti quali vitamine, antiossidanti, antimicrobici e antitumorali che lo rendono potenzialmente riciclabile quale materia prima ad elevato valore aggiunto per applicazioni farmaceutiche, alimentari, biomediche e cosmetiche. In alcuni casi, inoltre, questo sottoprodotto contiene un elevato potere calorifico che lo rende riciclabile come combustibile in centrali termoelettriche quale carbone verde. Infine, le microalghe possono essere coltivate utilizzando direttamente le emissioni provenienti da centrali termoelettriche o da altre sorgenti di emissioni inquinanti.

La potenzialità delle microalghe come fonte di biocarburanti è stato evidenziato da alcuni studi (Chisti, 2007) che suggeriscono che, per

poter soddisfare il 50% della domanda di biodiesel del settore trasporti degli Stati Uniti, il ricorso a piante terrestri richiederebbe superfici (da dedicare all'agricoltura) pari a circa il 24% della superficie americana, mentre l'utilizzo delle microalghe comporterebbe un utilizzo di superfici non superiore al 3%.

Tabella I.1 - Confronto nella produzione di biodiesel utilizzando biomasse differenti

Plant source	Seed oil content (% oil by wt in biomass)	Oil yield (L oil/ha year)	Land use (m ² year/kg biodiesel)	Biodiesel productivity (kg biodiesel/ha year)
Corn/Maize (<i>Zea mays</i> L.)	44	172	66	152
Hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.)	33	363	31	321
Soybean (<i>Glycine max</i> L.)	18	636	18	562
Jatropha (<i>Jatropha curcas</i> L.)	28	741	15	656
Camelina (<i>Camelina sativa</i> L.)	42	915	12	809
Canola/Rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	41	974	12	862
Sunflower (<i>Helianthus annuus</i> L.)	40	1070	11	946
Castor (<i>Ricinus communis</i>)	48	1307	9	1156
Palm oil (<i>Elaeis guineensis</i>)	36	5366	2	4747
Microalgae (low oil content)	30	58,700	0.2	51,927
Microalgae (medium oil content)	50	97,800	0.1	86,515
Microalgae (high oil content)	70	136,900	0.1	121,104

Osservando la Tabella I.1 si può notare che l'utilizzo di microalghe rappresenta un possibile metodo per sostituire almeno parzialmente il combustibile di origine fossile. Inoltre, a parte l'ovvio beneficio di natura ambientale, la recente istituzione del Mercato Europeo delle Emissioni potrebbe garantire ulteriori proventi derivanti dalla vendita delle quote di anidride carbonica non emesse. In questo mercato infatti le aziende, che hanno ridotto le loro emissioni di CO₂ rispetto ai valori massimi indicati dal Piano Nazionale di Allocazione delle Emissioni, possono vendere le quote di anidride carbonica non emesse a quelle aziende che invece hanno superato il tetto prestabilito dallo stesso Piano. Questo consente pertanto alla generica azienda che presenta emissioni di anidride carbonica di trarre ulteriori guadagni

dall'implementazione del processo basato sull'utilizzo delle microalghe.

I.3. Le diatomee

Microalga è un termine generico che indica un insieme geneticamente molto differente di organismi unicellulari fotosintetici in grado di utilizzare l'anidride carbonica e la luce solare per sopravvivere e replicarsi.

Le diatomee sono alghe unicellulari appartenenti alla classe delle *Bacillariophyceae* (divisione *Heterokontophyta*), comparse sul pianeta Terra circa 135 milioni di anni fa. Le più antiche diatomee risalgono al Giurassico Inferiore, ma ritrovamenti sono molto rari fino al Cretaceo Superiore. Esistono più di 250 generi differenti, costituiti a loro volta da più di 100'000 specie presenti in tutti i mari, laghi e fiumi del Pianeta (Norton et al., 1996). Questi organismi costituiscono il più importante gruppo eucariotico del fitoplankton e sono responsabili di circa il 40% della produttività primaria marina (Falwoski et al., 1998) (Figura I.2).

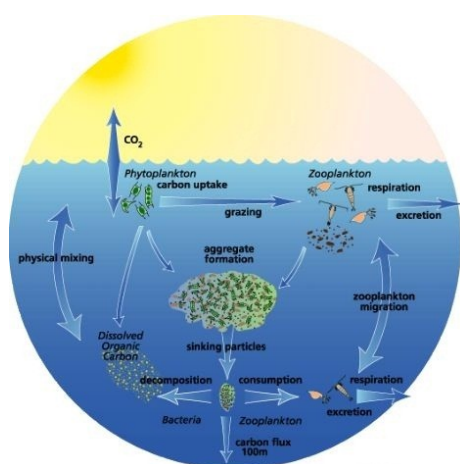


Figura I.2 - Ciclo del carbonio in ambiente marino

Le diatomee hanno dimensioni comprese tra i 10 e i 200 μm e sono state fra le prime alghe a colonizzare ogni superficie disponibile nella zona fotica (comprese rocce, gusci, sabbia, erba marina, nonché le superfici inferiori e superiori del ghiaccio polare). Alcune forme particolarmente resistenti al disseccamento sono state segnalate anche nelle sabbie desertiche.

Le diatomee sono più abbondanti numericamente all'inizio della primavera e in autunno quando l'intensità luminosa e la durata del giorno sono ottimali per la fotosintesi. Quando la popolazione di questi organismi aumenta la concentrazione da centinaia a migliaia di cellule per millilitro, l'acqua di mare si colora di verde - blu, giallo - marrone o rosso: questo fenomeno è conosciuto con il nome di **bloom algale** (Figura I.3)

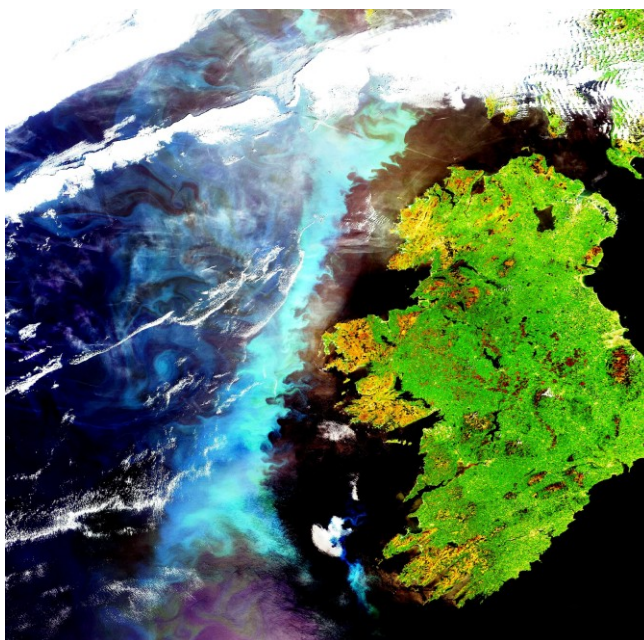


Figura I.3 – Immagine dal satellite di un bloom di fitoplankton nell'Oceano Atlantico a nord dell'Irlanda

La caratteristica principale delle diatomee è che sono provviste di un rivestimento esterno amorfo di natura silicea $[(\text{SiO}_2)_n(\text{H}_2\text{O})]$, chiamato **frustulo**, costituito da un'**epivalva** (porzione superiore più ampia) e un'**ipovalva** (porzione inferiore più stretta) (Figura I.4). Le due valve sono finemente perforate e sovrapposte in corrispondenza di una sottile banda circolare chiamata **cintura** o **pleura**. Essa è divisibile a sua volta in un **epicingulum** ed un **ipocingulum** (Falciatore et al., 2002).

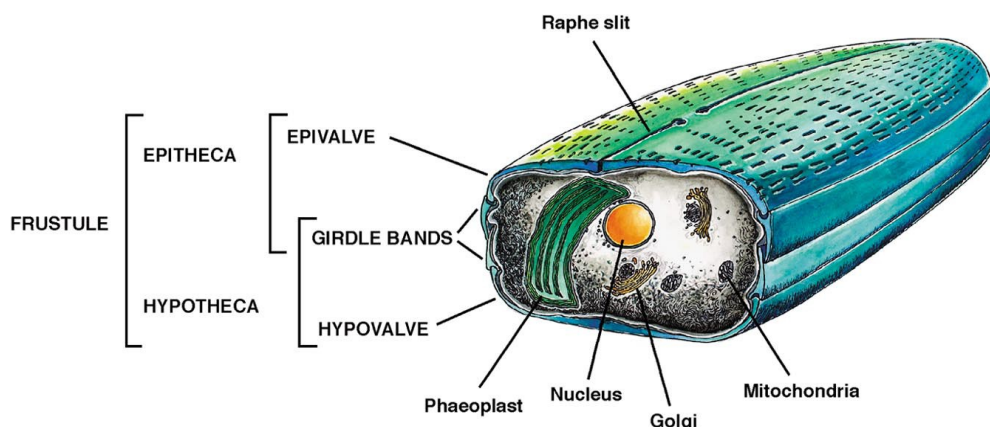


Figura I.4 - Struttura schematica di una diatomea

I depositi silicei presenti in ambiente marino, conosciuti come **farina fossile** o **diatomite**, possono divenire spessi centinaia di metri e ricoprire aree di molti chilometri quadrati. Questi depositi sono sfruttati a livello industriale soprattutto nella produzione di abrasivi. L'accumulo di tali volumi è possibile poiché le diatomee sono gli organismi più abbondanti negli oceani ed un solo litro di acqua di mare può contenere più di un milione di individui.

Le diatomee possono essere divise in due grandi gruppi in base alla simmetria con cui sono disposti i frustuli delle teche silicee (Van Den Hoek et al., 1997). Le diatomee **centriche** posseggono simmetria radiale mentre le diatomee **pennate** sono allungate e presentano simmetria bilaterale (Figura I.5).

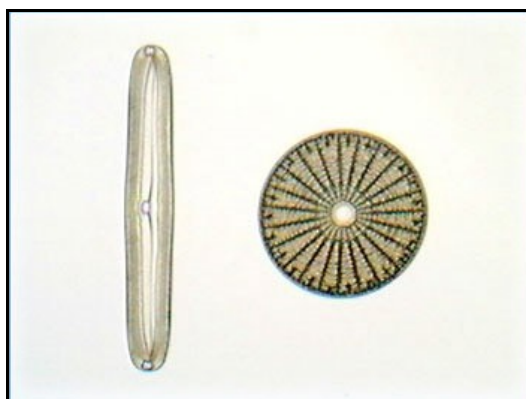


Figura I.5 - Struttura di una diatomea pennata (a sinistra) e una diatomea centrica (a destra)

Le diatomee centriche sono tutte planctoniche e sono particolarmente abbondanti in zone ricche di nutrienti e nelle regioni subpolari. Le diatomee pennate sono prevalentemente bentoniche e sono presenti in acque dolci, salmastre e marine di bassa profondità. Presentano perforazioni e strutture scheletriche disposte ad angolo retto rispetto alla linea mediana delle valve denominata **rafe**, attraverso la quale vengono secrete sostanze di natura polisaccaridica che permettono il movimento sulle superfici solide.

Durante la maggior parte della loro vita le diatomee si riproducono asessualmente per scissione binaria da 1 a 8 volte al giorno (Falciatore et al., 2002). La cellula madre si divide in due e ogni cellula figlia eredita una delle valve che agirà, in entrambe, come valva dorsale più grande (epivalva). Successivamente viene generata una nuova valva, leggermente più piccola (ipovalva) alloggiata entro l'epivalva (Figura I.6). In alcune specie, la dimensione media delle cellule diminuisce dopo ciascun ciclo cellulare e, quando una cellula raggiunge una

dimensione critica, corrispondente ad $1/3$ della taglia massima della specie, viene stimolata la riproduzione sessuale.

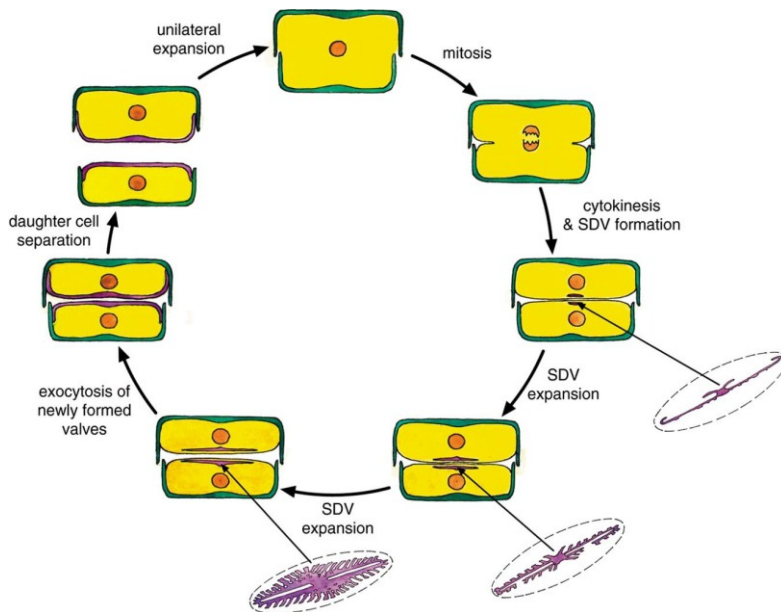


Figura I.6 – Schema della divisione cellulare mitotica di una diatomea

La gametogenesi, attraverso un processo meiotico, porta alla formazione di gameti morfologicamente uguali tra loro (**isogamia**) nelle diatomee pennate o differenti (**oogamia**) nelle diatomee centriche. Il prodotto della fusione dei gameti maschili e femminili genera un'**auxospora** diploide circondata da una membrana al cui interno si forma una nuova diatomea dalle massime dimensioni possibili. Sono disponibili informazioni frammentarie su questo argomento perché la fase sessuale della diatomee è limitata ad un breve periodo di tempo (minuti o ore), può avvenire meno di una volta l'anno e spesso coinvolge solo un piccolo numero di cellule

vegetative all'interno di una popolazione molto numerosa (Mann, 1993).

In risposta a particolari fattori (carenza di nutrienti, temperatura, intensità luminosa, pH) le diatomee possono produrre delle spore di resistenza che differiscono notevolmente dalle forme vegetative (Armbrust et al., 1990; Vaulot et al., 1986; Vaulot et al., 1987). Queste spore di resistenza possono germinare al ripresentarsi delle condizioni favorevoli per la crescita della specie. Le spore hanno valve molto ispessite e citoplasma denso e ricco di sostanze di riserva. Non tutti i cloni di una specie produttrice di spore producono forme di resistenza e non tutte le cellule di una stessa colonia sono in grado di farlo.

Come tutti gli eucarioti fotosintetici, le diatomee hanno un numero variabile di cloroplasti giallo-dorati (rossi in fluorescenza) aventi all'interno lamelle formate da tre tilacoidi racchiusi da una **lamella cingolare**. I cloroplasti sono circondati da una piega del reticolo endoplasmatico (ER cloroplastico) che può essere in continuità con l'involucro nucleare quando il cloroplasto è vicino al nucleo. Al loro interno è contenuto un **pirenoide**, un corpo proteico leggermente più scuro in confronto al resto del cloroplasto e contenente lamelle costituite da solamente due tilacoidi. Le diatomee centriche in genere hanno numerosi e piccoli cloroplasti di forma discoidale, mentre le diatomee pennate tendono a possedere un unico grande cloroplasto (Van Den Hoek et al., 1997).

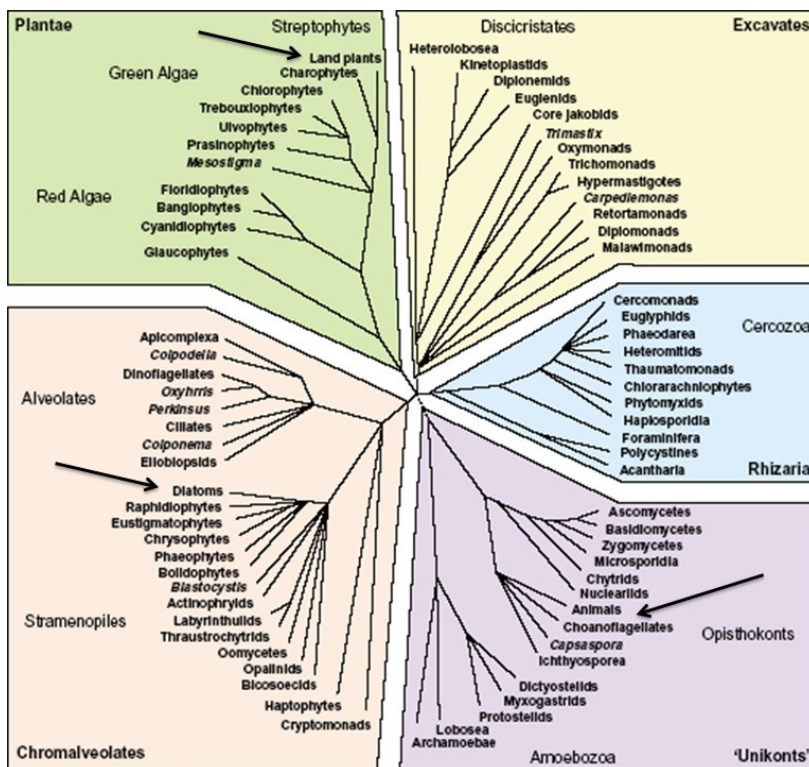


Figura I.7 - Albero filogenetico degli eucarioti

Mentre i plastidi delle alghe rosse, delle alghe verdi e delle piante sono normalmente circondati da due membrane, i cloroplasti delle diatomee sono caratterizzati dall'essere avvolti da quattro membrane. Analisi sull'RNA ribosomiale dei plastidi e comparazioni del genoma plastidiale hanno rivelato che le diatomee hanno avuto origine da un doppio evento endosimbiontico tra un'alga eucariotica e un secondo organismo eucariotico eterotrofo (Delwiche et al., 1997). Inoltre analisi su migliaia di EST generati dal sequenziamento casuale dei cDNA di *Phaeodactylum tricornutum* hanno messo in evidenza che molti geni delle diatomee sono più omologhi a quelli degli animali che agli equivalenti delle piante (Scala et al., 2002) (Figura I.7).

Le diatomee contengono clorofilla *a* e *c* e, come pigmenti accessori, presentano il β -carotene e le tre xantofille: fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina, che conferiscono il colore bruno-dorato caratteristico dei membri della linea.

Oltre al frustulo siliceo, la composizione chimica delle diatomee è piuttosto simile a quella delle altre microalghe (Parsons et al. 1961; Haug et al. 1973;). Generalmente le cellule sono costituite per il 30 - 60% da proteine, 5 - 20% da carboidrati e 10 - 50% da lipidi in peso secco (Fernandez-Reiriz et al., 1989; Paul et al., 2009). In ogni caso, la composizione chimica varia in funzione delle condizioni di crescita, della disponibilità dei nutrienti, dell'intensità luminosa e delle ore di luce - buio.

In particolare, gli acidi grassi componenti i lipidi delle diatomee sono acidi grassi a media e lunga catena con 16, 20 e 22 atomi di carbonio; tra gli acidi grassi insaturi prevalgono l'acido palmitoleico (16:1) e l'acido eicosapentaenoico (20:5) (d'Ippolito et al., 2005; Fontana et al., 2007; Hu et al., 2008).

E' possibile classificare in tre gruppi i carboidrati caratteristici delle diatomee (Alekseeva et al., 2005):

- ☞ **polisaccaridi strutturali:** sono eteroglicani costituenti la parete cellulare delle diatomee, con un contenuto variabile in proporzioni tra galattosio, glucosio, mannosio, fucosio, xilosio (Haug et al., 1976; Granum et al., 2002).
- ☞ **polisaccaridi di riserva:** il principale prodotto di riserva delle diatomee è un β -1,3-glucano, il **crisolaminarano**, che è solubile

in acqua e può presentare delle ramificazioni al C-2 e al C-6 (Paulsen et al., 1978; McConville et al., 1986; Granum et al., 2002);

✎ **polisaccaridi extracellulari:** sono complessi eteroglicani e la loro struttura differisce notevolmente dai carboidrati intracellulari. Spesso formano rivestimenti viscosi intorno alle cellule, con funzione di aggregazione cellulare, scambio ionico, protezione da predatori e locomozione per le specie bentoniche (Wustman et al., 1997; Staats et al., 1999).

I.4. Dalle colture microalgali alla produzione di biodiesel

I.4.1. Le colture microalgali

Il concetto di cattura della CO₂ e di produzione di biocombustibili rinnovabili mediante colture microalgali su vasta scala era già stato proposto negli anni '50 (Oswald et al., 1960) ed è stato oggetto di estesa attività di ricerca e sviluppo, soprattutto negli Stati Uniti (Sheehan et al., 1998) e in Giappone (Hamasaki et al. 1994; Usui et al., 1997; Murakami et al., 1997). Dal 1978 al 1996, il Dipartimento dell'Energia degli Stati Uniti ha investito più di 25 milioni di dollari in un programmi per sviluppare carburanti rinnovabili da microalghe (Sheehan et al., 1998).

L'Aquatic Species Program (ASP) si è concentrato sulla raccolta e identificazione di microrganismi fotosintetici che producono alte concentrazioni di olio e alla progettazione dei sistemi di coltivazione su larga scala per la produzione di biocarburanti, utilizzando le specie che erano state selezionate in laboratorio.

La crescita delle microalghe avviene generalmente in 3 fasi (Figura I.8):

- ☞ **fase esponenziale**, in cui il tasso di crescita della popolazione rimane sempre positivo nel tempo e dipendente da nutrienti, temperatura e illuminazione disponibili nell'ambiente (mezzo di coltura).
- ☞ **fase stazionaria**, in cui il tasso di crescita della popolazione è molto rallentato o azzerato; per colture estensive è conveniente mantenere la curva di crescita in questa fase.
- ☞ **fase senescente**, in cui le cellule tendono a morire, essendo sospesa sia la fase di divisione cellulare sia la fase metabolica. Coincide con l'esaurimento di nutrienti nel mezzo di coltura o con l'instaurarsi di condizioni avverse alla crescita (temperature non idonee, presenza di sostanze tossiche, illuminazione inadeguata).

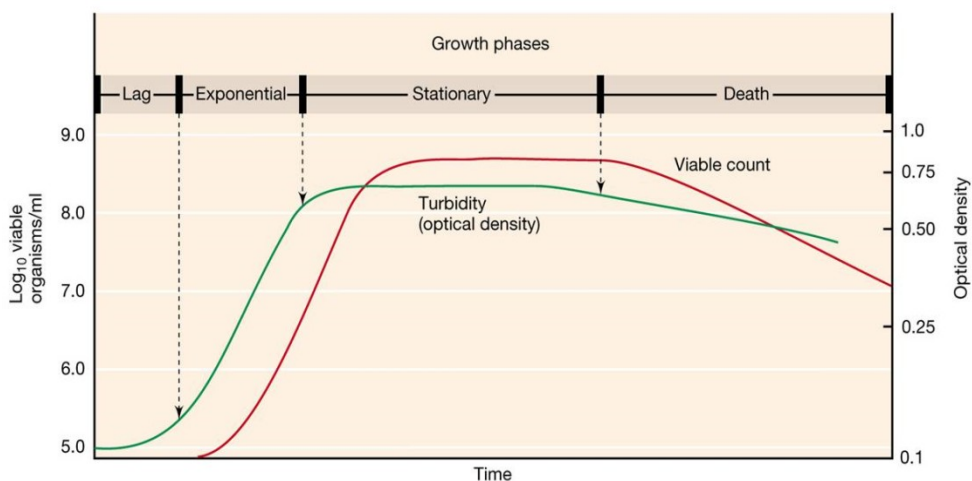


Figura I.8 - Esempio di curva di crescita microalgale

I.4.2. I fotobioreattori

Storicamente, la crescita intensiva di microalghe avviene mediante due tecniche differenti: le colture in **vasche all'aperto (open ponds)** e quelle in **fotobioreattori chiusi**. Anche le vasche possono essere considerate dei fotobioreattori, ma si preferisce usare questo termine per indicare in modo specifico sistemi chiusi, in cui non vi è scambio diretto tra coltura e gas atmosferici .

☞ Le **vasche per colture all'aperto** possono essere di diversa foggia (Figura I.9). La più semplice è una vasca in cui le microalghe crescono essenzialmente come fanno in natura, sospese nella colonna d'acqua e rimescolate solo dal vento. Benché molto usate nel trattamento delle acque reflue e anche in alcuni sistemi di produzione commerciale di microalghe, tali tipi di vasche presentano una produttività molto bassa. Ciò è dovuto almeno in parte alla carenza di CO₂ che è assorbito solo attraverso la superficie aperta dell'impianto. Per ottenere un'omogenea distribuzione della CO₂ è necessaria la presenza di un meccanismo di agitazione della vasca.

Uno dei primi sistemi all'aperto con agitazione per la coltura intensiva di alghe è stata una vasca a struttura circolare, sviluppata in Giappone negli anni cinquanta per coltivare in maniera intensiva la microalga verde *Chlorella* (Tamiya, 1957) e usata dagli anni sessanta per la sua produzione commerciale.



Figura I.9 - Due esempi di vasche all'aperto per la coltivazione massiva delle microalghe

I principali svantaggi di questo tipo di vasca sono associati alla sua limitata dimensione e al costo elevato nella costruzione e gestione del sistema di agitazione. Agli inizi degli anni cinquanta vennero studiate per la prima volta in California le vasche aperte note con il nome di *raceway* (chiamata anche vasca ad alta velocità) per il trattamento di acque reflue. Nei *raceway*, l'agitazione della coltura è ottenuta mediante una pompa di

ricircolo che tiene in costante movimento il liquido contenuto nella vasca (Oswald et al., 1960). Un elemento fondamentale di questa tecnica è la possibilità di utilizzare direttamente i gas di combustione emessi dalle centrali elettriche. La concentrazione di CO₂ (CO₂ disciolta + acido carbonico) a cui le cellule algali sono effettivamente esposte nelle vasche è relativamente bassa, essendo al massimo a livello di quella dei gas di combustione (equivalente a meno del 10% di CO₂ in fase gassosa) e inoltre solo limitate nel tempo, perché la CO₂ viene consumata mano a mano che le alghe crescono nelle vasche. Nel corso degli anni passati (a partire dagli anni cinquanta) numerose ricerche, per lo più condotte in laboratorio (Olaizola, 2003) e in misura minore in colture all'aperto (Matsumoto et al., 1995; Pedroni et al., 2004), hanno dimostrato che è possibile coltivare efficacemente le microalghe utilizzando direttamente i gas di combustione. La possibilità di eliminare insieme alla CO₂ contaminanti aggiuntivi ai gas di combustione di centrali elettriche, in particolare NO_x e SO_x, costituisce un'opportunità per integrare lo smaltimento di questi gas con la coltura di microalghe. Nelle quantità in cui sono effettivamente assorbiti (in funzione dei coefficienti di trasferimento di massa del sistema di trasferimento del gas di combustione), questi contaminanti reagiscono in acqua producendo acidi diluiti che vengono neutralizzati dall'alcalinità del mezzo di coltura. Nel caso degli NO_x, sia NO sia NO₂ vengono utilizzati dalle microalghe (Negoro et al., 1993; Nagase et al., 2001) senza alcun cambiamento netto di pH del mezzo di crescita.

La produzione annuale di biomassa algale in vasche può raggiungere le 110 t/ha. Questa stima si basa su molti presupposti favorevoli legati al sito e su una produttività di biomassa media annua di $30 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$. Anche i costi operativi per energia, nutrienti, mantenimento e gestione, compresi la raccolta e il processamento delle alghe, sono più elevati per le colture di microalghe che per le tipiche colture di piante da raccolto o di alberi (Singh et al., 2010; Mata et al., 2010; Verma et al., 2010). Il costo capitale delle vasche ad alta velocità con agitazione mediante ruote a pale e rivestimento in argilla può essere stimato, approssimativamente, in 100'000 \$/ha per sistemi su vasta scala (superiori a 100 ettari) (Singh et al., 2010; Mata et al., 2010; Verma et al., 2010). Tale cifra comprende anche il costo delle infrastrutture (acqua, energia e rifornimento di CO_2 per l'impianto) e dei sistemi di raccolta della biomassa e successivo processamento.

- ☞ I **fotobioreattori chiusi** (Figura I.10) esistono di varie forme e possono essere divisi in due grandi gruppi: tubulari (orizzontali, verticali, elicoidali) e a lamina piana (a forma rettangolare verticali o orientati in direzione solare).

Sono attualmente molto utilizzati per l'ottenimento di prodotti ad alto valore aggiunto a partire dalle microalghe.



Figura I.10 - Due esempi di fotobioreattori: in alto uno tubulare e in basso uno a lamina piatta

Di fatto, i fotobioreattori chiusi sono stati l'elemento d'interesse principale della maggior parte delle attività di ricerca e sviluppo sulle microalghe negli ultimi due decenni. Sono stati studiati per

applicazioni sulla riduzione dei gas serra durante gli anni novanta in Giappone (Maeda et al., 1995; Usui et al., 1997) e più recentemente negli Stati Uniti (Olaizola, 2003). L'importanza principale dei fotobioreattori chiusi è rappresentata dalla loro capacità di garantire produttività molto più alte di quelle che si ottengono in vasca aperta evitando, al contempo, contaminazioni esterne e permettendo un maggiore controllo dei parametri chimico-fisici. Il limite maggiore dei fotobioreattori chiusi è comunque il loro elevato costo capitale e operativo. I costi più bassi pubblicati per i fotobioreattori sono circa di 50 \$/m² (Tredici, 1999), valore dieci volte maggiori di quelli per le vasche all'aperto.

C'è però un vantaggio dei fotobioreattori chiusi: essi consentono la coltivazione di ceppi algali che non sarebbero utilizzabili in vasche all'aperto a causa di contaminazioni biologiche dovute ad altre specie di microalghe o di organismi che si cibano di alghe. Inoltre, i fotobioreattori chiusi possono avere un ruolo importante nelle tecnologie per diminuire i gas serra e per la produzione dell'inoculo microalgale richiesto per le colture operate in vasche all'aperto su larga scala. L'abbondante preparazione di inoculi prodotti in condizioni controllate sarebbe un passaggio molto critico qualora si dovessero coltivare ceppi algali migliorati geneticamente. Tali ceppi risulterebbero particolarmente suscettibili alla contaminazione e al sopravvento da parte di ceppi selvatici di microalghe e di altri organismi (Mata et al., 2010; Greenwell et al., 2010; Verma et al., 2010).

I.4.3. La produzione mondiale di biocarburanti da microalghe

La coltivazione di microalghe è diventata un'attività di grande importanza economica per la produzione di biomassa che viene impiegata per una molteplicità di scopi che vanno da quello alimentare, a quello medico, farmaceutico e cosmetico, per un mercato mondiale di diversi milioni di dollari (Lehmann, 2007). Le microalghe, presentano un contenuto proteico fino a 25 volte superiore a quello del latte, e possiedono elevate quantità di acidi grassi poliinsaturi (PUFA) della serie ω -3. Inoltre contengono quantità elevate di vitamine tipo A, B, C, D, E, K e B12. Tali proprietà ne fanno un pregevole materiale come integratore alimentare nella dieta umana ed animale. In campo cosmetico, l'elevata quantità e varietà di sostanze organiche contenute nelle cellule algali hanno un effetto depurativo e drenante per il corpo. In campo medico le microalghe vengono saggiate come promettenti fonti di sostanze dotate di proprietà antibatteriche, antivirali e antitumorali.

Il più grande investimento economico per la produzione di biocarburante da microalghe fatto da una compagnia europea sino ad oggi è di 26 milioni di sterline da parte della UK Carbon Trust con lo scopo di creare la prima grande "industria" di alghe in Nord Africa (<http://www.carbontrust.co.uk/News/presscentre/2008/algae-biofuels-challenge.htm>).

Come si evince dalla Figura I.11 la maggior parte delle compagnie che si occupano di produzione di biocarburanti da biomasse microalgali sono diffuse soprattutto negli Stati Uniti d'America e solo il 13% sono quelle di origine europea (Singh et al., 2010).

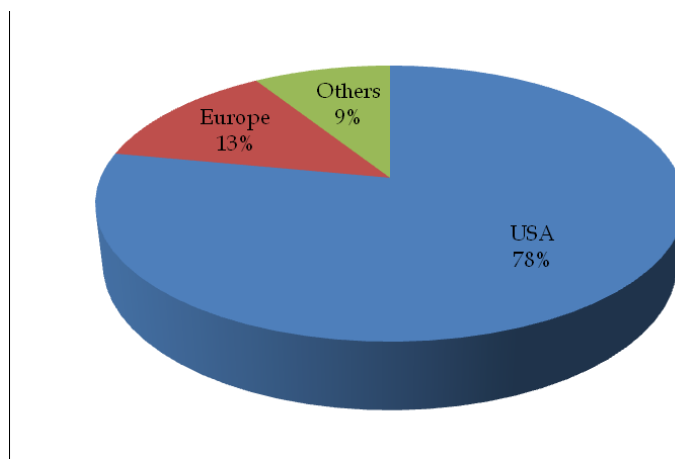


Figura I.11 – Distribuzione mondiale delle compagnie produttrici di biocarburanti da microalghe

I paesi Mediterranei (compresi fra il 45° e il 30° parallelo Nord) sono i quelli che presentano caratteristiche migliori dal punto di vista ambientale e climatico per la crescita e la coltivazione delle microalghe. In particolare i paesi a sud del Mediterraneo (Marocco, Algeria, Tunisia, Egitto, Libia), dove si registrano temperature medie che durante l'anno non scendono mai al di sotto dei 15°C e dove sono presenti enormi zone desertiche non adatte all'agricoltura (Singh et al., 2010), sembrano essere le regioni più adatte per la produzione massiva. La scarsità di acqua in queste zone aride non sembra essere un problema, in quanto per la crescita delle microalghe non è necessaria acqua fresca e potabile ma è possibile utilizzare acqua di mare, salmastra e persino acque reflue.

A tal proposito una compagnia spagnola l'Aurantia in collaborazione con la Green Fuel Tech del Massachusetts (USA) nel 2007 ha deciso di investire 92 milioni di dollari per produrre oli dalle microalghe.

Questo progetto prevede l'utilizzo di 100 ettari di terreno vicino a Jerez (Spagna) con lo scopo di produrre 25'000 tonnellate di biomassa microalgale all'anno.

Nel 2008 la compagnia italiana ENI ha installato a Gela (Sicilia) il primo impianto pilota a vasca aperta che occupa una superficie dalle dimensioni di 1 ha per la produzione di oli da microalghe (Singh et al., 2010).

I.4.4. Raccolta della biomassa

La coltivazione di ceppi microalgali ad alta produttività in vasche all'aperto o fotobioreattori, è solo il primo passo in un processo di riduzione dei gas serra. La biomassa algale deve essere poi raccolta e convertita in un carburante rinnovabile. La raccolta delle microalghe, cioè la concentrazione delle microscopiche cellule dalle soluzioni diluite contenute nelle vasche di coltura intensiva, rappresenta un passaggio fondamentale e un limite nei processi di produzione. Negli anni sono stati sviluppati tre tipi principali di tecniche: la centrifugazione, la filtrazione e la flocculazione, quest'ultima seguita da sedimentazione o da flottazione ad aria disciolta (Greenwell et al., 2010; Paul et al. 2009; Mata et al., 2010).

La **centrifugazione** può essere utilizzata per la maggior parte dei tipi di alghe benché sia sconsigliabile per quelle con cellule molto fragili, come *Dunaliella*. Il problema principale sono i costi delle centrifughe, sia d'acquisto sia operativi, troppo elevati per qualsiasi processo di riduzione dei gas serra e anche per lo smaltimento delle acque reflue.

La centrifugazione può essere presa in considerazione in un passaggio di raccolta secondario, finalizzato alla concentrazioni della biomassa, in volumi di liquido limitato. Tale metodo di concentrazione secondaria è stata proposta in diversi studi di ingegneria economica, possibilmente in associazione all'estrazione di oli da biomassa algali con concentrazioni di olio particolarmente elevate (Benemann et al., 1996).

La **filtrazione** viene usata in campo commerciale per raccogliere *Spirulina*, un cianoatterio filamentoso. Il processo risulta relativamente a basso costo in quanto prevede l'utilizzo dei cosiddetti microfiltri. Tuttavia, la filtrazione è limitata a tipi di microalghe filamentose o che producono colonie di dimensioni tali da essere trattenute da filtri con pori superiori a 20 μm (Molina Grima et al., 2003).

La **flocculazione** chimica, utilizzando calce, allume, cloruro di ferro e/o polielettroliti, è il metodo più generale e diffuso e per raccogliere le microalghe. Essa sfrutta la carica negativa delle pareti cellulari che viene neutralizzata dall'agente flocculante consentendo la formazione di grandi fiocchi che poi vengono recuperati per sedimentazione o per flottazione ad aria disciolta. Quest'ultima opzione è quella generalmente preferita perché, anche se un po' più costosa, produce una biomassa più concentrata. La raccolta con flocculanti chimici è usata in numerosi impianti di smaltimento delle acque reflue e in quelli di produzione commerciale di *Dunaliella*. Tali processi sono, tuttavia, ancora piuttosto costosi, sia per i flocculanti sia per l'operatività. Inoltre, il flocculante chimico può interferire nel

processamento della biomassa, nella digestione anaerobica o nel riciclaggio dei nutrienti (Molina Grima et al., 2003).

Molte diatomee sono in grado di bioflocculare. Questo fenomeno consiste nell'aggregazione spontanea delle cellule algali in grandi fiocchi che si depositano poi abbastanza rapidamente. Il processo dipende dalla produzione di polimeri che fanno aggregare le cellule tra loro, tuttavia cosa innesci e controlli il fenomeno non è al momento chiaro. La **bioflocculazione** è spesso osservata in laboratorio, in natura e anche nelle vasche di trattamento delle acque reflue. Si ritiene che il processo possa dipendere da diversi fattori, incluso proprietà genetiche della specie e condizioni ambientali, come la scarsità di azoto e di altri nutrienti (Mata et al., 2010; Chun-Yen et al., 2011).

I.4.5. I biocarburanti da biomasse

Il passaggio finale del processo è la conversione della biomassa raccolta in biocombustibili. Tali processi si basano o su processi biologici, in particolare fermentazioni per produrre metano o etanolo, o su processi chimici, come la gassificazione e la pirolisi, per la produzione di oli e idrocarburi utilizzabili nella conversione a biodiesel.

- ☞ Sono state condotte molte ricerche finalizzate alla produzione di metano (in realtà biogas con una composizione di circa 50:50 $\text{CH}_4:\text{CO}_2$) dalla biomassa algale. Queste attività sono soprattutto in relazione al trattamento di acque reflue usando le microalghe

dal momento che la fermentazione per produrre metano (**digestione anaerobica**) è una tecnologia ampiamente praticata in quel campo ed è anche un mezzo potenzialmente a basso costo e con rendimenti elevati per recuperare energia. La digestione anaerobica dei fanghi di acque reflue, sia quelli primari (acque di scarico sedimentate) sia quelli secondari (fanghi attivi sedimentati) viene effettuata negli impianti di trattamento in grandi contenitori d'acciaio o di cemento. Si tratta di una tecnologia consolidata basata sulla naturale decomposizione della biomassa ad opera di batteri anaerobi.

- ☞ Le **fermentazioni a etanolo** sono limitate a zuccheri, amidi e carboidrati facilmente fermentabili. Tipicamente le microalghe contengono solo il 20% circa o meno di tali carboidrati, presenti sotto forma di amido nelle alghe verdi e di glicogeno nei cianobatteri. Affinché la produzione di etanolo sia praticabile, è necessaria una biomassa algale con un alto contenuto in carboidrati fermentabili superiore al 60% del peso secco. Questo accumulo così elevato di amido o di glicogeno si osserva solo in condizioni di limitazione di azoto, in cui la crescita cellulare è ridotta e buona parte della CO₂ fissata fotosinteticamente è immagazzinata sotto forma di riserve.
- ☞ Il processo di **gassificazione** consiste nell'ossidazione incompleta di una sostanza in ambiente ad elevata temperatura (900 - 1000 °C) per la produzione di un gas combustibile (Paul et al., 2009).

☞ La **pirolisi** è un processo di decomposizione termochimica di materiali organici, ottenuto mediante l'applicazione di calore, a temperature comprese tra 400 e 800 °C, in completa assenza di un agente ossidante, oppure con una ridottissima quantità di ossigeno (in quest'ultimo caso il processo può essere descritto come una parziale gassificazione). I prodotti della pirolisi sono sia gassosi, sia liquidi, sia solidi, in proporzioni che dipendono dai metodi di pirolisi (pirolisi veloce, lenta o convenzionale) e dai parametri di reazione (Mohan et al., 2006).

Gli altri principali combustibili ottenibili dalle microalghe sono quelli che le alghe possono produrre da sé: oli vegetali e idrocarburi.

I lipidi presenti nelle cellule microalgali possono essere divisi in due grandi classi: i **lipidi polari** (glicolipidi, fosfolipidi, sulfolipidi) e i **lipidi neutri** (monogliceridi, digliceridi, trigliceridi, steroli, carotenoidi) (Figura I.12).

La composizione relativa dei lipidi delle microalghe dipende dalla specie presa in considerazione, dalle condizioni ambientali, di temperatura, di intensità luminosa e dalla disponibilità di nutrienti (Hu et al., 2008; Roessler, 1990). È stato dimostrato che le microalghe accumulano più trigliceridi in assenza o bassa concentrazione di azoto (Rodolfi et al., 2008; Roessler, 1990) mentre le diatomee aumentano la biosintesi dei trigliceridi in limitazione di silicio (Shifrin et al., 1981; Roessler, 1990).

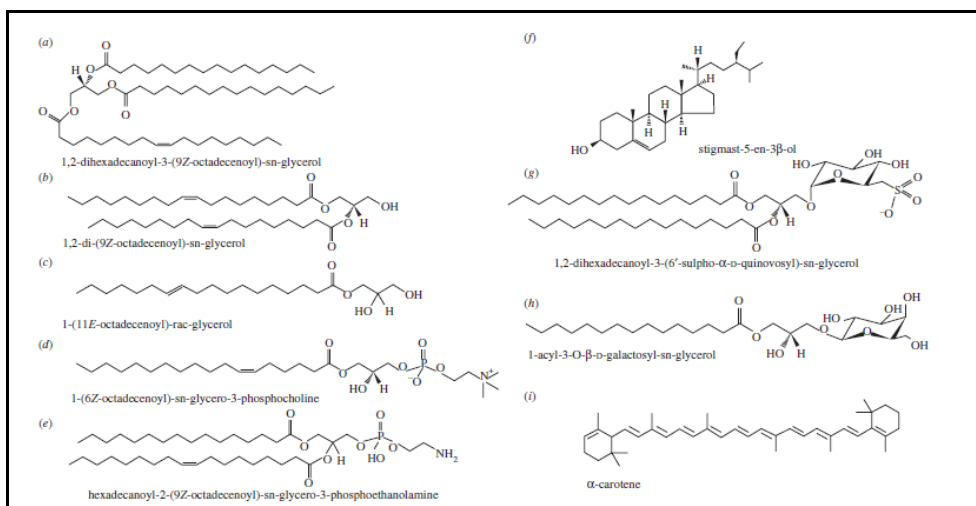


Figura I.12 – Struttura chimica dei principali lipidi microalgali [(a) trigliceridi; (b) digliceridi; (c) monogliceridi; (d,e) fosfolipidi; (f) steroli; (g) sulfolipidi; (h) glicolipidi; (i) carotenoidi]

Il biodiesel è prodotto da un reazione di **trans-esterificazione** a partire dai trigliceridi (il **bioolio**) a cui è aggiunto metanolo. Questa reazione produce gli esteri metilici degli acidi grassi, il **biodiesel**, e glicerolo (Figura I.13)

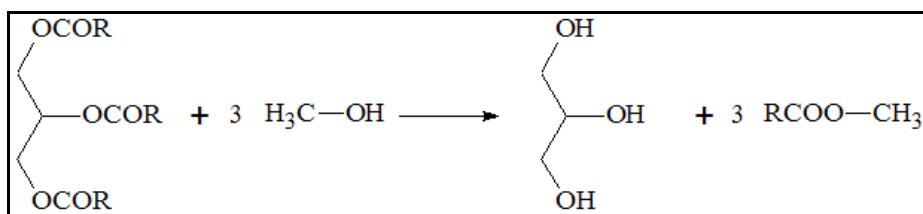


Figura I.13 - Reazione di trans-esterificazione di un trigliceride con metanolo; R è una catena lineare generalmente lunga da 16 a 22 atomi. Il primo prodotto indicato è il glicerolo, il secondo è il generico estere metilico che costituisce il biodiesel.

Dopo tale procedimento, contrariamente al semplice olio vegetale, il biodiesel possiede proprietà di combustione e viscosità simili al diesel

ricavato dal petrolio e può sostituirlo nella maggior parte dei suoi impieghi. Come sottoprodotto si forma glicerolo che, adeguatamente depurato, è altrettanto commercializzabile. Le sostanze ausiliarie residue, compresa l'acqua di produzione possono essere reimmesse nel ciclo.

Le proprietà chimico-fisiche del biodiesel sono determinate dalla struttura degli acidi grassi che lo costituiscono. Mentre le insaturazioni e di conseguenza il profilo degli acidi grassi, sembrano non influenzare la reazione di trans-esterificazione, invece determinano alcune importanti proprietà del biocarburante prodotto. Gli acidi grassi saturi producono un biodiesel con una maggiore stabilità ossidativa, con un più alto numero di cetani e con un aspetto gelatinoso a temperatura ambiente. Il biodiesel prodotto da biomasse ricche di PUFA (acidi grassi poli-insaturi), invece, è caratterizzato da una facile ossidazione e grandi problemi di instabilità nei periodi prolungati di conservazione (Chisti, 2007; Hu et al., 2008).

Gli idrocarburi sono lipidi neutri simili a quelli del petrolio che nelle microalghe verdi, in genere, sono presenti in una quantità inferiore al 5% in peso secco. La microalga verde unicellulare *Botryococcus braunii*, in condizioni di crescita non favorevoli o in condizioni di stress, tende a formare colonie e ad accumulare grandi quantità di idrocarburi in una percentuale che può variare dal 25% fino al 86% in peso secco (Dayananda et al., 2005).

L'impiego di diatomee come biomassa fotosintetica, potrebbe garantire la produzione di oli combustibili e biodiesel a partire dal contenuto lipidico di queste microalghe che varia tra il 15 e il 44% in

peso. Inoltre, la biomassa residua potrebbe costituire una fonte di proteine e carboidrati per la produzione di biogas, quali bioidrogeno e biometano.

CAPITOLO II

SCREENING DELLE MICROALGHE

II.1. Introduzione

Le microalghe oleaginose possono appartenere a diversi gruppi tassonomici e il contenuto lipidico totale può variare notevolmente fra gruppi tassonomici diversi e fra individui della stesse specie.

Le microalghe verdi oleaginose mostrano un contenuto medio di lipidi di circa 25.5% in peso secco della biomassa totale (Rodolfi et al., 2009). La quantità di lipidi aumenta considerevolmente (raddoppia o triplica) quando le cellule sono cresciute in condizioni di stress, raggiungendo il 45.7% in peso secco (Figura II.1). Analisi statistiche indicano che il contenuto medio di lipidi delle diatomee è del 22.7% quando cresciute in condizioni normali e del 44.6% in condizioni di stress (Hu et al., 2008; Rodolfi et al., 2009).

Obiettivo primario nella produzione di biodiesel da microalghe è individuare e selezionare una specie microalgale molto produttiva (lipidi/litro di coltura per giorno) e al contempo robusta e resistente per una crescita massiva (Sheehan et al., 1998).

Rodolfi et al. (Rodolfi et al., 2009) hanno già riportato uno screening di 30 strain differenti di microalghe marine e di acqua dolce in base alla produzione lipidica e di biomassa, scegliendo come specie migliore per la produzione di biocarburante uno strain di *Nannochloropsis sp.*

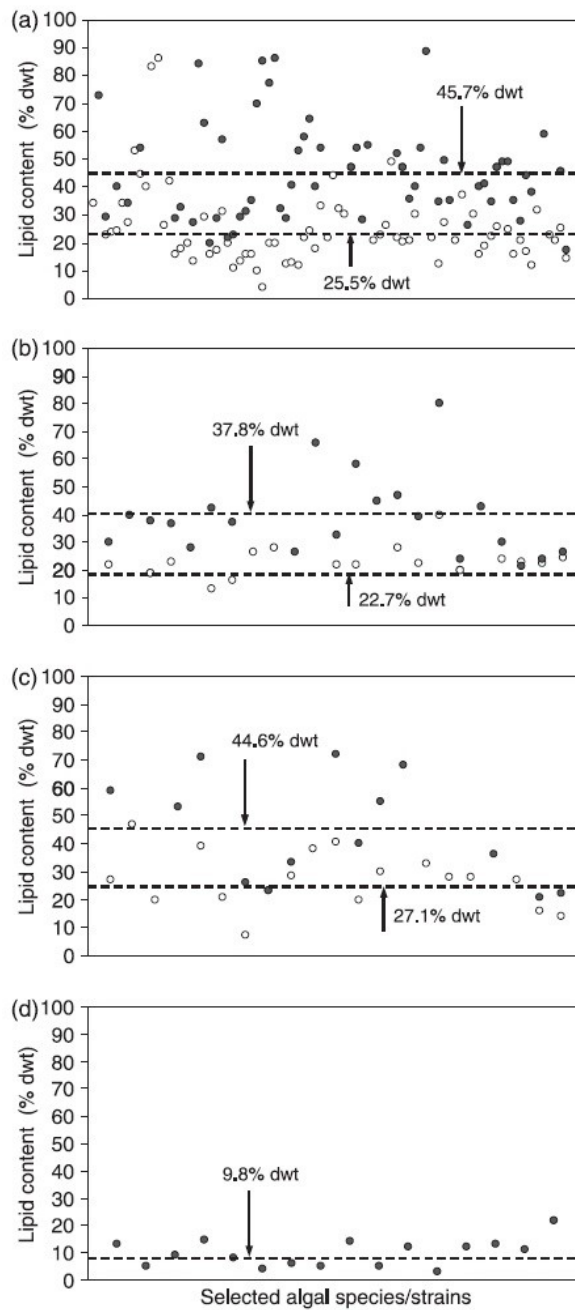


Figura II.1 - Contenuto lipidico totale in varie classi di fitoplankton in condizioni normali (cerchio bianco) e in condizioni di stress (cerchio nero) [(a) microalghe verdi; (b) diatomee; (c) microalghe eucariotiche appartenenti ad altri taxa; (d) cianobatteri]

Griffiths et al. (Griffiths et al., 2009) hanno paragonato i dati di letteratura disponibili su 55 microalghe appartenenti a generi differenti in base alla produttività lipidica e di biomassa. Nonostante le numerose difficoltà nel comparare i dati ottenuti in diverse condizioni di crescita, questi autori sottolineano le scarse informazioni presenti in letteratura sulle caratteristiche genetiche da prendere in considerazione per la selezione della microalga più adatta alla produzione di biocarburanti.

Obiettivo preliminare del mio lavoro di tesi dottorale è stato lo screening di 21 microalghe marine, cresciute in condizioni fisiologiche, con lo scopo di stabilire il valore potenziale di ogni singolo strain nella produzione di biocombustibili, soprattutto biodiesel.

II.2. Materiali e metodi

II.2.1. Condizioni di crescita delle microalghe

Le 21 microalghe prese in considerazione (riportate in Tabella II.1) sono state acquistate tutte presso il Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton at the Bigelow Laboratory for Ocean Sciences (West Boothbay Harbor, Maine – USA), tranne la *Thalassiosira weissflogii* P09 che è stata isolata presso la stazione zoologica di Napoli “Anton Dohrn”.

Tabella II.1 – Tassonomia e dimensioni delle 21 microalghe oggetto di studio

N°	Microalga	Classe	Dimensioni (a=lunghezza; b=larghezza)
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=22-36 μm b=8-10 μm
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=6-12 μm b=4-8 μm
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=18-34 μm b=6-24 μm
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=18-30 μm b=16-20 μm
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=16-24 μm b=16-19 μm
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=12-20 μm b=10-12 μm
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=13-18 μm b=10-12 μm
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=12-22 μm b=10-12 μm
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=4-6 μm b=4-5 μm
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=11-16 μm b=9-10 μm
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=4-6 μm b=4-5 μm
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=4-6 μm b=4-5 μm
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	<i>Bacillariophyceae</i>	a=54-74 μm b=2-7 μm
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	<i>Bacillariophyceae</i>	a=18-26 μm b=2-3 μm
15	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	<i>Bacillariophyceae</i>	a=54-87 μm 1-2= μm
16	<i>Ditylum brightwelli</i> CCMP 358	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=40-81 μm b=12-38 μm
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	<i>Coscinodiscophyceae</i>	a=16-24 μm b=14-26 μm
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	<i>Eustigmatophyceae</i>	a=3-8 μm b=2-4 μm
19	<i>Dunaliella salina</i> CCA 19/18	<i>Chlorophyceae</i>	a=6-9 μm b=0-2 μm
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	<i>Chlorophyceae</i>	a=6-9 μm b=1-3 μm
21	<i>Chlamydomonas</i> sp CCMP 222	<i>Chlorophyceae</i>	a=7-14 μm b=5-10 μm

I ceppi microalgali sono state cresciuti in carboy autoclavabili in polipropilene e policarbonato da 2 litri contenenti 1.5 litri di acqua di mare, proveniente dal Golfo di Napoli (salinità circa 40 g/L, misurata utilizzando un rifrattometro ATC 106).

Per ottenere crescite monospecifiche è stato necessario filtrare l'acqua di mare mediante filtri Millipore con pori del diametro di 0.22 μm ed effettuare la sterilizzazione in autoclave alla temperatura di 121 °C ed alla pressione di 1 atm per 20 minuti. Successivamente si è proceduto all'aggiunta dei nutrienti, anch'essi autoclavati, ad eccezione delle

vitamine che, per la loro struttura chimica, risultano essere altamente sensibili alla temperatura (Helm, 1990) e che per questa ragione sono state solamente filtrate (filtri Millipore, 0.22 μm).

L'acqua di mare è stata arricchita con le soluzioni stock dei nutrienti del medium di crescita f/2 (Guillard et al., 1962):

- ☞ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O} = 30 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 883 μM).
- ☞ $\text{NaNO}_3 = 75 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 107 μM).
- ☞ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 5 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 36.3 μM).
- ☞ Soluzione oligoelementi (1 mL/L) contenente (g/L): Na_2EDTA 4.36 (concentrazione finale 11.7 μM) , $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 3.15 (concentrazione finale 11.7 μM), $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0.18, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.022, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.006.
- ☞ Vitamine (mg/L): biotina 0.5, cobalamina 0.5 e tiamina-HCl 100.0.

Na_2SiO_3 è stato aggiunto solo alle colture delle diatomee, in quanto fondamentale per la crescita di queste microalghe e in particolare per la formazione dei frustuli delle teche.

Per controllare il pH durante le fasi della crescita, è stato usato come tampone il Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 400 mM pH 7.8 (5 mL/L, concentrazione finale 2 mM).

Le colture sono esposte a luce artificiale con un'intensità di $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sottoposte ad un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 ore di buio, alla temperatura di $20 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e con insufflazione costante di aria.

II.2.2. Parametri controllati durante le crescite microalgali

Tutti gli strain analizzati sono stati cresciuti in batch fino a che le cellule non hanno raggiunto la loro fase senescente. La crescita cellulare è stata monitorata quotidianamente mediante conta cellulare con camera di Bürker e osservazione della morfologia utilizzando un microscopio ottico a contrasto di fase (Nikon Eclipse E400) con un ingrandimento di 20 X. La camera di Burker è costituita da nove quadrati delimitati da tre linee affiancate e possiede un volume totale di 0.1 mm^3 ($10^{-4} \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$); la concentrazione di cellule per mL (cells/mL) è stata determinata mediante il seguente calcolo:

$$\text{cells/mL} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

Quando le cellule hanno raggiunto la fase senescente, la coltura microalgale è stata fermata e centrifugata a 2300 g (Allegra X12R - Beckman Coulter) per 10 minuti (per le diatomee) e per 15 minuti (per le microalghe verdi) a $8 - 10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e il pellet così ottenuto è diviso in tre parti per effettuare le seguenti analisi:

- ☞ determinazione del contenuto proteico;
- ☞ determinazione del contenuto di carboidrati intracellulari;
- ☞ determinazione del contenuto lipidico.

Il peso secco è stato stimato dopo aver lavato il pellet cellulare con formato di ammonio 0.5 M per rimuovere i sali dell'acqua di mare e del medium di crescita (Zhu et al., 1997). Il pellet microalgale così ottenuto è liofilizzato in modo tale da poter determinare il peso secco della biomassa.

II.2.3. Tempi di duplicazione

La divisione cellulare è stata espressa considerando il tempo di duplicazione (dt):

$$dt = (t_2 - t_1) \times \ln 2 / (\ln N_2 / N_1)$$

dove N_1 e N_2 sono il numero di cellule (cells/mL) al tempo t_1 (inizio della curva di crescita e t_2 (fine della curva di crescita).

II.2.4. Determinazione del contenuto proteico

Il contenuto proteico totale è stato determinato mediante saggio colorimetrico di Lowry (Bio-Rad DC Protein Assay), utilizzando come standard una retta di taratura preparata con quantità note di albumina di siero bovino (BSA).

Il pellet liofilizzato è stato ridissolto in H_2O distillata 1:1 (w/v) e la rottura cellulare è stata effettuata a 100 MHz mediante un bagnetto a ultrasuoni (UltraSONIK NDI). A 50 μ L di pellet microalgale sono stati aggiunti 10 μ L di Triton X-100 al 25% per favorire ulteriormente la rottura cellulare mediante l'uso di un detergente. Il campione è stato

lasciato 15 minuti a temperatura ambiente. Sono poi stati aggiunti 190 μL di tampone fosfato 50 mM pH 7.0, per un volume totale di 250 μL , che successivamente è stato centrifugato a 9390 g per 5 minuti (Thermo ALC PK131R).

Sono stati aggiunti in provetta 50 μL di tampone fosfato 50 mM pH 7.0, Triton X-100 all'1% e il campione per un volume totale di 50 μL , 100 μL di reattivo A+S (20 μL di reattivo S/1 mL di reattivo A; soluzione alcalina di tartrato di rame) e 800 μL di reattivo B (reagente di Folin). Si saggiavano tre concentrazioni differenti per ogni campione: 5 μL , 10 μL e 20 μL . Tutte le miscele sono state incubate a temperatura ambiente per 15 minuti al buio e poi sono state effettuate le letture spettrofotometriche a $\lambda=655$ nm (UV/Vis spectrophotometer DU-730 - Beckman Coulter). Il caratteristico colore blu è dovuto alla presenza degli amminoacidi triptofano e tirosina e, in misura minore, cisteina e istidina.

II.2.5. Determinazione del contenuto di carboidrati

La determinazione del contenuto di carboidrati intracellulari è stato effettuato mediante il saggio fenolo/acido solforico (Dubois et al., 1956), ricavato da una metodica di analisi spettrofotometrica dei carboidrati totali. La retta di taratura è stata costruita con concentrazioni diverse di D-glucosio.

Le cellule microalgali liofilizzate sono state sottoposte a idrolisi acida con H_2SO_4 6 N per 2 ore e successivamente centrifugate a 9390 g per 5

minuti (Thermo ALC PK131R); il saggio colorimetrico è stato effettuato sul surnatante ottenuto dopo centrifugazione.

Ai campioni sono stati aggiunti 25 μL di una soluzione acquosa di fenolo 5% (w/v) e 2.5 mL di acido solforico (98% v/v). La miscela è stata agitata rapidamente ed è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono state effettuate letture di assorbanza a $\lambda=490$ nm contro un bianco costituito da 1 mL di H_2O distillata (UV/Vis spectrophotometer DU-730-Beckman Coulter). I surnatanti sono stati opportunamente diluiti per ottenere concentrazioni rientranti nel range di linearità della retta di taratura.

II.2.6. Determinazione del contenuto lipidico totale

L'estratto lipidico totale è stato ottenuto mediante estrazione con il metodo di Folch modificato (Folch et al., 1957). Ad una quantità nota di biomassa liofilizzata si aggiunge metanolo in rapporto 1:1 (w/v) e si sonica per 2 minuti a 100 MHz mediante un UltraSONIK NDI. Successivamente si centrifuga a 2930 g per 5 minuti, si raccoglie il surnatante e al pellet residuo si aggiunge in rapporto 1:1 (w/v) una soluzione di cloroformio/metanolo ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$) 2:1. Si centrifuga a 2930 g per 5 minuti e si ripete lo stesso passaggio di estrazione per tre volte. Al surnatante raccolto nei diversi passaggi si aggiunge H_2O distillata in rapporto 1:1 (v/v), si agita e si centrifuga a 2930 g per 5 minuti. Si ottiene una miscela a tre fasi: la fase superiore, corrispondente alla fase acquosa, la fase intermedia costituita dal pellet residuo e la fase inferiore corrispondente alla fase organica

contenente la frazione lipidica di interesse. Dopo la rimozione della fase acquosa, la fase lipidica è portata a secco sotto costante flusso di azoto o mediante rotovapor.

II.2.7. Analisi qualitativa e quantitativa dell'estratto lipidico totale

L'estratto lipidico totale è stato analizzato dal punto di vista qualitativo mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su lastre in gel di silice (10 x 20 cm), eluite in etere di petrolio / etere etilico (9:1 e 6:4 v/v) e cloroformio/metanolo/acqua (65:25:4 v/v/v) e rivelate mediante reagenti specifici quali:

- ☞ reattivo di Dittmer e Lester per i fosfolipidi (Dittmer et al., 1964);
- ☞ α -naftolo per i glicolipidi (Kundu, 1981);
- ☞ solfato di cerio ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) per mettere in evidenza tutti i lipidi (sia polari che neutri).

L'analisi quantitativa dell'estratto lipidico delle 21 microalghe prese in esame è stata effettuata mediante spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare protonica (^1H -NMR) su metà dell'estratto lipidico sciolto in 0.7 ml di $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1 v/v), usando uno spettrometro Bruker AMX-400 che opera a 400 MHz accoppiato con un inverse TCI Cryoprobe.

Come standard interno sono stati usati 100 μg (10 μL da una soluzione di 1 mg/100 μL) di methyl paraben (estere metilico dell'acido p-idrossibenzoico) i cui protoni aromatici risuonano a 7.9 e 6.8 ppm. Sono stati integrati i segnali a 5.4 ppm, 2.8 ppm, 2.4 ppm e 2.0 ppm: tali segnali rappresentano rispettivamente i protoni in

posizione vinilica (acidi grassi insaturi), i protoni in posizione bis-allilica (acidi grassi polinsaturi), i protoni in posizione α al gruppo carbossilico (acidi grassi totali) (Figura II.2).

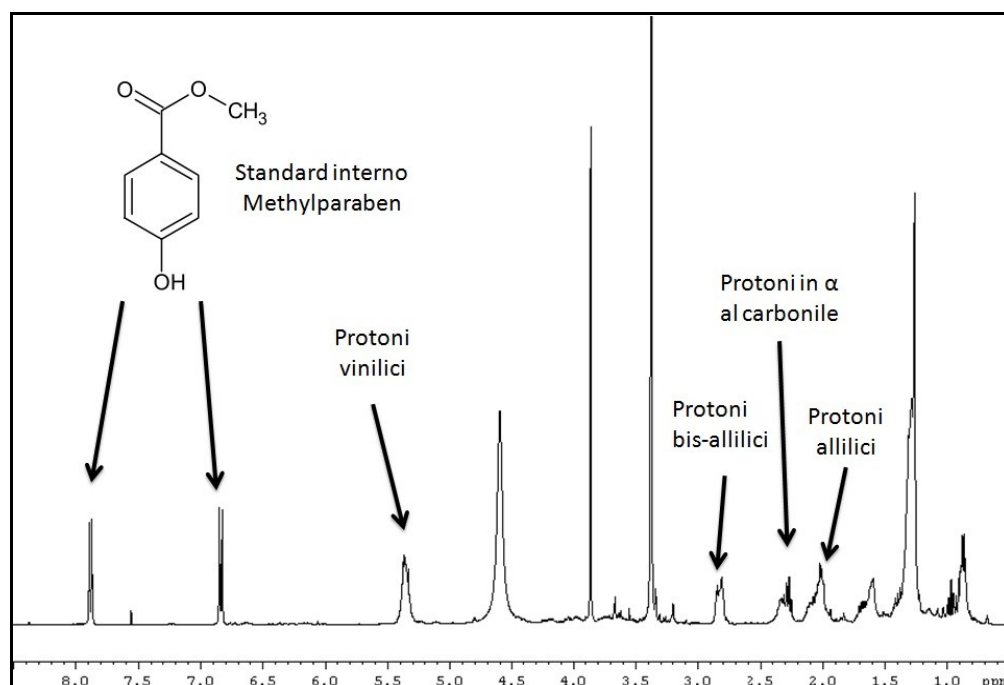


Figura II.2 - Spettro ^1H -NMR a 400 MHz di un estratto lipidico totale

Dallo spettro ^1H -NMR è possibile ottenere la percentuale di acidi grassi insaturi e saturi presenti nell'estratto lipidico in analisi mediante il seguente calcolo:

$$\% \text{ acidi grassi insaturi} = \left[\frac{(\text{area protoni allilici}/2)}{\text{area protoni in } \alpha \text{ al carbonile}} \right] \times 100$$

$$\% \text{ acidi grassi saturi} = 100 - \% \text{ acidi grassi insaturi}$$

II.2.8. Determinazione della composizione lipidica

L'estratto lipidico ottenuto in precedenza (paragrafo II.2.6.) è stato metilato con l'aggiunta di diazometano e lasciato a reagire a temperatura ambiente per 1 ora. Il campione è stato poi portato a secco sotto flusso N_2 e ridiscioltto in diclorometano 1:1 (w/v). L'estratto lipidico è stato purificato mediante cromatografia di adsorbimento su colonna di silice ed eluito in etere di petrolio/etere etilico 98:2 (v/v) per recuperare gli acidi grassi metilati, in etere di petrolio/etere etilico 9:1 (v/v) per ottenere i lipidi neutri (e in particolare i trigliceridi), in cloroformio e successivamente in acetone/metanolo 9:1 (v/v) per avere i glicolipidi e in metanolo per i fosfolipidi. Le varie classi lipidiche ottenute dall'eluizione della colonna di silice sono portate a secco sotto costante flusso di azoto o mediante rotovapor.

II.2.9. Analisi della composizione degli acidi grassi

La composizione degli acidi grassi totali è stata determinata mediante GC-MS. Metà dell'estratto lipidico totale, ottenuto come descritto nel paragrafo II.2.6., è stato trans-esterificato con l'aggiunta di Na_2CO_3 in metanolo a 42 °C per 4 ore. La reazione è neutralizzata poi con HCl 1 M e gli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) sono stati estratti con etere etilico 1:1 (v/v). La miscela di FAME è stata analizzata usando un gas cromatografo accoppiato con uno spettrometro di massa (Focus GC-Polaris Q): iniettore 260 °C, detettore 260 °C, gradiente di

temperatura da 160 °C a 260 °C in 5 °C/min. Come standard interno è stato usato l'acido pentadecanoico (soluzione stock 5 mg/20 mL).

II.3. Risultati e discussione

II.3.1. Tempi di duplicazione e curve di crescita

Ogni microalga oggetto di questo lavoro di tesi è caratterizzata da uno specifico ciclo cellulare dipendente dall'inoculo (numero di cellule all'inizio della curva di crescita) e dalle caratteristiche genetiche delle cellule. Per poter paragonare microalghe appartenenti a classi differenti, sono stati presi in considerazione i rispettivi tempi di duplicazione (Tabella II.2).

Come riportato nella Tabella II.2, le diatomee hanno un tempo di duplicazione più basso (15 - 34 h) rispetto alle microalghe verdi (44 - 83 h).

Le dimensioni delle cellule tendono ad influenzare il numero massimo di cellule (cells/mL) che può essere raggiunto durante la curva di crescita e di conseguenza il tempo di duplicazione. Le diatomee hanno grandezze che variano da 23 a 400 $\mu\text{m}^2/\text{cell}$, eccetto *D. brightwelli* CCMP 358 che può raggiungere le dimensioni di 1500 $\mu\text{m}^2/\text{cell}$. Le microalghe verdi sono in genere più piccole con dimensioni che variano da 7 a 78 $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ (Tabella II.2).

Tabella II.2 – Tempi di duplicazione, giorni di crescita, cells/mL all’inizio della curva di crescita e nel punto massimo delle 21 microalghe analizzate

N°	Microalga	Tempo di duplicazione (h)	Giorni di crescita	Numero di cellule iniziale (cells/mL)	Numero massimo di cellule (cells/mL)
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	18	6	3.3×10^3	2.1×10^5
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	16	6	2.5×10^3	3.4×10^5
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	17	6	2.5×10^3	1.5×10^3
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	17	6	3×10^3	1.2×10^5
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	19	6	2×10^3	1×10^5
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	16	5	6×10^3	1.7×10^5
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	22	5	1.4×10^4	1.9×10^5
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	24	5	1.2×10^4	3×10^5
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	24	7	3.8×10^4	2×10^6
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	28	12	1.2×10^4	4×10^5
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	23	6	4×10^4	1.6×10^6
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	16	6	2.5×10^4	1.1×10^6
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	15	6	4.9×10^4	6.8×10^5
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	29	10	1×10^6	1.5×10^7
15	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	15	9	4×10^3	8.6×10^5
16	<i>Ditylum brightwelli</i> CCMP 358	34	11	7×10^2	2.2×10^4
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	25	9	2.4×10^3	1.7×10^5
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	44	20	8.5×10^5	1×10^8
19	<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	83	19	3.5×10^5	4×10^6
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	51	13	5.4×10^5	1×10^7
21	<i>Chlamydomonas</i> sp CCMP 222	30	11	3.3×10^4	2.3×10^6

Queste caratteristiche si riflettono nelle curve di crescita e nel numero massimo raggiunto alla fine del ciclo cellulare. Le diatomee presentano curve di crescita più brevi (5 - 12 giorni) delle microalghe verdi (11 - 20 giorni) e una minore densità cellulare nel punto massimo della curva di crescita (Tabella II.2). Queste differenze sono molto importanti per poter scegliere la microalga più adatta in una crescita in continuo in fotobioreattore poiché colture più veloci, come quelle delle diatomee permettono un più alto fattore di diluizione e

quindi progettazione e utilizzo di fotobioreattori che richiedono superfici illuminate minori. Inoltre l'elevata velocità di crescita riduce il rischio di eventuali contaminazioni in sistemi a bassa sterilità come i fotobioreattori.

II.3.2. Produttività in termini di biomassa e di lipidi

La produzione di biomassa e di lipidi delle microalghe è stata paragonata nel primo punto della fase senescente della curva di crescita di ogni specie.

La produzione di biomassa espressa come mg/L (Tabella II.3) è molto alta per le microalghe verdi come *N. salina* CCMP 369 (728.48 mg/L), *D. tertiolecta* CCMP 1320 (546.69 mg/L) e *D. salina* CCAP19/18 (433.47 mg/L), mentre le diatomee che mostrano la maggiore resa in biomassa risultano essere *P. tricornutum* CCMP 632 (280.00 mg/mL), *C. fusiformis* CCMP 343 (213.14 mg/L) e *T. weissflogii* P09 (175.68 mg/L).

Tuttavia, poiché le microalghe verdi hanno curve di crescita che durano più giorni di quelle delle diatomee (Tabella II.2), le produttività di queste specie in risultano essere molto simili (Tabella II.3): *C. fusiformis* CCMP 343 (30.45 mg/L/giorno), *P. tricornutum* CCMP 632 (25.45 mg/L/giorno), *T. weissflogii* P09 (29.28 mg/L/giorno), *N. salina* CCMP 369 (34.69 mg/L/ giorno), *D. tertiolecta* CCMP 1320 (39.05 mg/L/ giorno) e *D. salina* CCAP 19/18 (21.67 mg/L/ giorno).

Tabella II.3 – Resa (mg/L) e produttività in biomassa delle 21 microalghe analizzate

N°	Microalga	Biomassa (mg/L)	Produttività biomassa (mg/L/giorno)
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	135.51	19.36
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	28.77	4.11
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	41.06	5.87
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	50.04	7.15
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	44.69	6.38
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	175.68	29.28
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	96.70	16.12
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	94.55	15.76
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	55.81	6.98
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	109.25	8.40
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	85.40	12.20
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	71.38	10.20
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	213.14	30.45
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	280.00	25.45
15	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	49.32	4.93
16	<i>Ditylum brightwelli</i> CCMP 358	80.82	6.74
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	113.35	11.34
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	728.48	34.69
19	<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	433.47	21.67
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	546.69	39.05
21	<i>Chlamydomonas</i> sp CCMP 222	109.45	15.87

Per quanto riguarda la produzione di lipidi, un più alto contenuto lipidico è associato ad una maggiore biomassa. Le specie più produttive risultano essere (Tabella II.4): *T. weissflogii* P09 (43.64 mg/L), *C. cryptica* CCMP 331 (38.80 mg/L) e *C. fusiformis* CCMP 343 (33.43 mg/L) fra le diatomee e *N. salina* CCMP 369 (152.73 mg/L), *D. salina* CCAP 19/18 (104.34 mg/L) e *D. tertiolecta* CCMP 1320 (135.89 mg/L).

Tabella II.4 – Resa (mg/L) e produttività in lipidi delle 21 microalghe analizzate

N°	Microalga	Lipidi (mg/L)	Produttività lipidi (mg/L/giorno)
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	13.76	1.97
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	1.32	0.19
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	3.50	0.50
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	3.03	0.43
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	3.79	0.54
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	43.64	7.27
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	29.20	4.87
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	20.91	3.48
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	13.76	1.72
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	38.80	2.98
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	5.92	0.85
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	4.59	0.66
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	33.43	4.78
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	23.00	2.09
15	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	5.57	0.56
16	<i>Ditylum brightwelli</i> CCMP 358	6.82	0.57
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	18.75	1.88
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	152.73	7.27
19	<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	104.34	5.22
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	135.89	9.71
21	<i>Chlamydomonas</i> sp CCMP 222	35.80	2.98

Considerando che le curve di crescita delle microalghe durano da 11 a 20 giorni mentre quelle delle diatomee da 5 a 12 giorni (Tabella II.2), anche le produttività lipidiche (mg/L/giorno) delle diatomee e delle microalghe verdi risultano essere molto simili: 7.27 mg/L/giorno per *T. weissflogii* P09, 4.78 mg/L/giorno per *C. fusiformis* CCMP 343, 2.98 mg/L/giorno per *C. cryptica* CCMP 331, 7.27 mg/L/giorno per *N. salina* CCMP 369, 5.22 mg/L/giorno per *D. salina* CCAP 19/18 e 9.71 mg/L/giorno per *D. tertiolecta* CCMP 1320 (Tabella II.4).

Risulta evidente che i dati ottenuti per quanto la produttività in biomassa e in termini di lipidi sono più bassi rispetto a quelli riportati in letteratura (Fernandez-Reiriz et al., 1989; Hu et al., 2008; Griffiths et al., 2009; Rodolfi et al., 2009) ma in questo lavoro di tesi è stato per la prima volta eseguito uno screening microalgale nelle condizioni di crescita fisiologiche, rispettando le caratteristiche di ogni specie, le curve di crescita e valutandone il potenziale come specie modello per la produzione di biocarburanti.

II.3.3. Composizione chimica percentuale delle microalghe

La frazione organica di ogni microalga è essenzialmente costituita da lipidi, proteine e carboidrati. I lipidi vengono utilizzati nella produzione di biodiesel, la frazione proteica può essere usata come fertilizzante, mentre i carboidrati possono essere digeriti anaerobicamente per produrre biometano o bioidrogeno.

La percentuale lipidica delle diatomee (Tabella II.5) varia dal 4.59% (*C. socialis* CCMP 3263) al 35.51% (*C. cryptica* CCMP 331), mostrando alti valori nei tre strain di *T. weissflogii* (22-30%), in *T. pseudonana* CCMP 1335 (24.66%) e in *P. tricornutum* CCMP 632 (22.87%). Tutte le microalghe verdi sono caratterizzate da una percentuale lipidica compresa fra il 19% e il 25%: *N. salina* CCMP 369 (20.97%) *D.salina* CCAP19/18 (24.07%) and *D. tertiolecta* CCMP 1320 (24.86%).

Tabella II.5 – Percentuale di lipidi, proteine e carboidrati delle 21 microalghe rispetto al peso secco della biomassa

N°	Microalga	% lipidi	% proteine	% carboidrati
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	10.17	18.97	23.75
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	4.59	34.66	10.90
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	8.52	22.28	22.89
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	6.05	18.92	7.32
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	8.47	30.49	37.63
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	24.84	22.41	4.82
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	30.20	17.01	10.29
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	22.12	34.61	4.52
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	24.66	7.62	11.42
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	35.51	15.56	6.18
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	6.93	16.52	5.53
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	6.43	9.27	9.42
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	15.68	8.82	9.57
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	22.87	19.07	18.60
15	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	11.29	55.96	16.48
16	<i>Ditylum brightwelli</i> CCMP 358	8.44	17.17	14.71
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	18.80	24.23	5.36
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	20.97	15.05	5.19
19	<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	24.07	56.63	6.21
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	24.86	27.44	2.77
21	<i>Chlamydomonas</i> sp CCMP 222	18.79	26.63	6.40

La percentuale proteica varia dal 7.62% in *T. pseudonana* CCMP 1335 al 56.63% in *D. salina* CCAP19/18, mentre i valori dei carboidrati risultano essere molto bassi nelle microalghe verdi (3 - 7%), indicando che queste specie non sono utilizzabili come biomasse per la produzione di biogas attraverso processi fermentativi. Al contrario la quantità di carboidrati è maggiore nelle diatomee dove le percentuali variano dal 4.52% di *T. weissflogii* CCMP 1336 fino al 37.63% di *T. rotula* TR2 CCMP 3264.

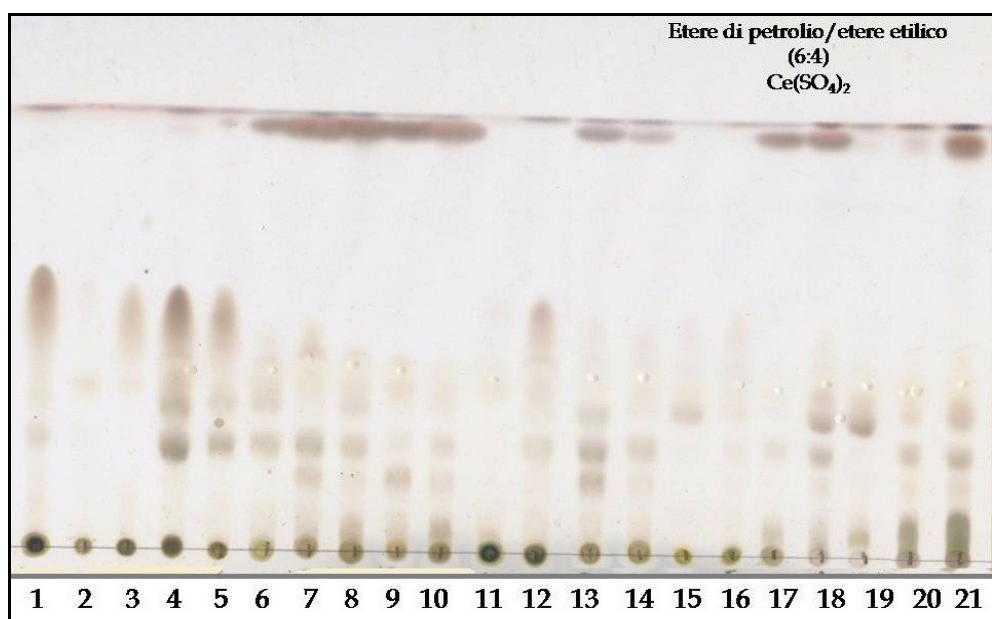
Le quantità di lipidi, proteine e carboidrati rappresentano solo la frazione organica del peso secco delle microalghe e questa può variare dal 25% al 87% (Tabella II.5). La parte restante del peso secco può essere costituito da materia inorganica (Zhu et al., 1997), da silice (per le diatomee), da carboidrati insolubili, come ad esempio la cellulosa (che costituisce la parete cellulare) e da azoto di origine non proteica.

II.3.4. Composizione lipidica

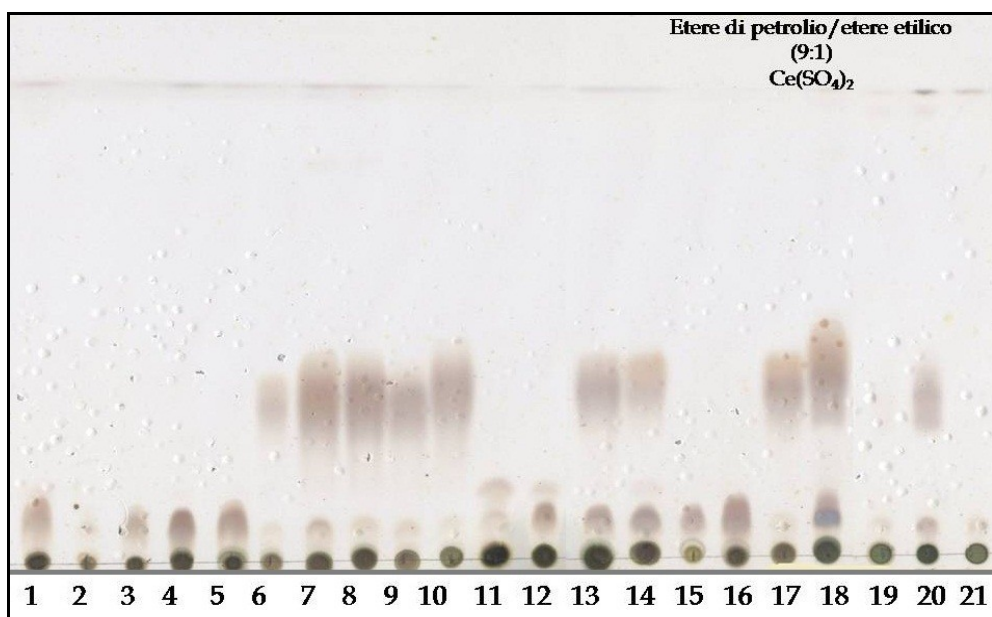
Il profilo lipidico delle microalghe è in genere caratterizzato dalla presenza di lipidi neutri (monogliceridi, digliceridi e trigliceridi), glicolipidi e fosfolipidi. Le proporzioni relative delle varie classi sono influenzate dalle condizioni di crescita. Sia i lipidi polari che neutri possono essere convertiti in biodiesel ma i trigliceridi rappresentano la frazione lipidica preferita in quanto possono essere trasformati in biodiesel da una semplice reazione di trans-esterificazione.

È importante considerare nell'estratto lipidico totale delle 21 microalghe la presenza di acidi grassi liberi, che non possono essere utilizzati per la produzione di biodiesel.

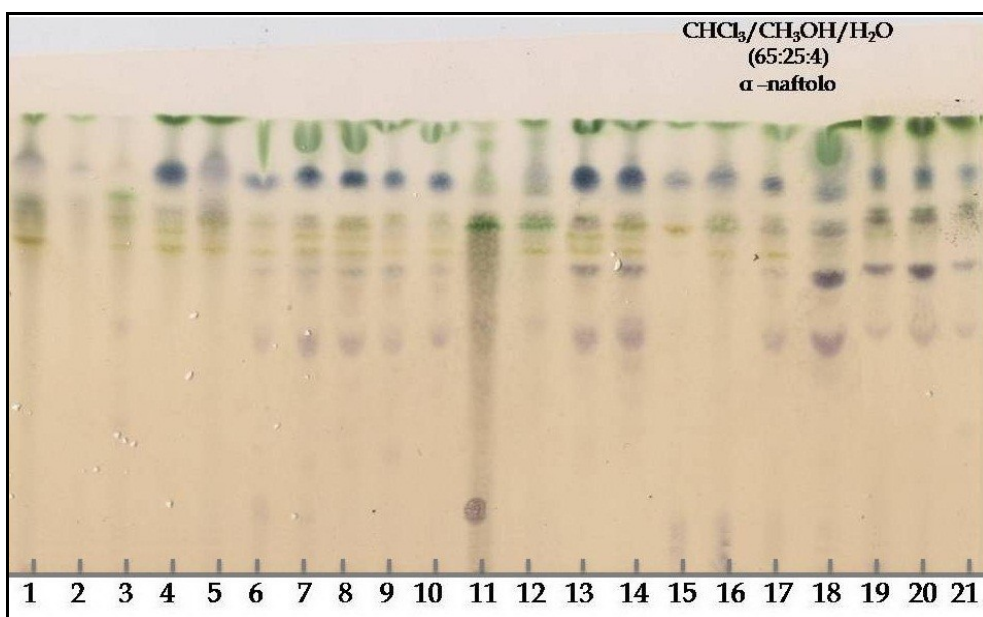
In alcune specie di diatomee è stato riportato che i lipidi complessi sono idrolizzati da differenti lipasi con il rilascio di acidi grassi liberi, presenti già pochi secondi dopo la raccolta della biomassa mediante centrifugazione (d'Ippolito et al., 2004; Cutignano et al., 2006).



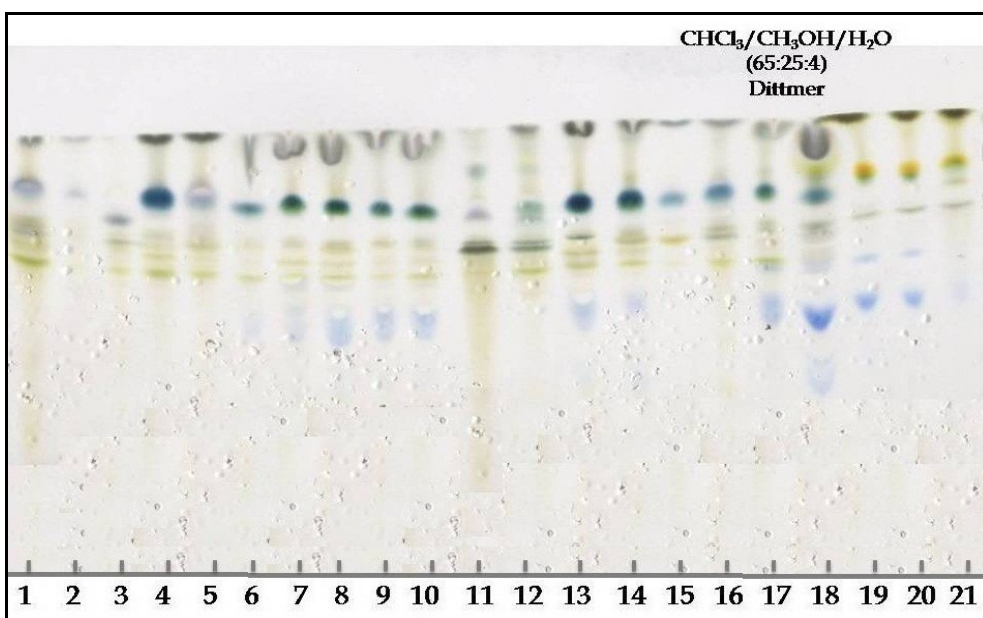
II.3 - TLC dell'estratto lipidico totale delle 21 microalghe in etere di petrolio/etere etilico 6:4 (v/v) e rivelate per $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; per la numerazione Tabella II.6



II.4 - TLC dell'estratto lipidico totale delle 21 microalghe in etere di petrolio/etere etilico 9:1 (v/v) e rivelate per $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$; per la numerazione Tabella II.6



II.5 - TLC dell'estratto lipidico totale delle 21 microalghe in CHCl₃/CH₃OH/H₂O 65:25:4 (v/v) e rivelate per α-naftolo; per la numerazione Tabella II.6



II.6 - TLC dell'estratto lipidico totale delle 21 microalghe in CHCl₃/CH₃OH/H₂O 65:25:4 (v/v) e rivelate per Dittmer; per la numerazione Tabella II.6

Tabella II.6 – Classi lipidiche e percentuale relative costituenti le 21 microalghe

N°	Microalga	Acidi grassi liberi (%)	Lipidi neutri (%)	Glicolipidi (%)	Fosfolipidi (%)
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	100	0	0	0
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	100	0	0	0
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	100	0	0	0
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	100	0	0	0
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	100	0	0	0
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	7	58	19	16
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	8	54	20	18
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	10	51	21	18
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	5	19	55	21
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	0	55	23	22
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	100	0	0	0
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	100	0	0	0
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	7	18	54	21
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	0	29	50	21
15	<i>PseudoNitzschia pseudodelicatissima</i> B317	100	0	0	0
16	<i>Ditylum brightwelli</i> CCMP 358	52	0	19	29
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	2	28	39	32
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	27	20	31	22
19	<i>Dunaliella salina</i> CCA19/18	8	6	48	38
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	5	17	53	25
21	<i>Chlamydomonas</i> sp CCMP 222	3	7	60	30

Alcune diatomee come le tre specie di *Chaetoceros*, i due strain di *T. rotula*, i due strain di *S. marinoi* e *P. pseudodelicatissima* B317 sono caratterizzati dall'aver una forte attività lipasica in quanto tutti i lipidi sono presenti sotto forma di acidi grassi liberi (Tabella II.6; Figure II.3 e II.4). Poiché il biodiesel è ottenuto da una reazione di trans-esterificazione a partire da lipidi complessi, queste diatomee non possono essere usate per la produzione di questo biocombustibile.

Altre microalghe mostrano una parziale idrolisi dei lipidi complessi (Figure II.3, II.4, II.5 e II.6). Alcune specie, come ad esempio i tre strain di *T. weissflogii* e *C. cryptica* CCMP 331, presentano un'elevata percentuale di lipidi neutri, con valori anche superiore al 50%, ed un livello di glicolipidi e fosfolipidi del 19 - 23% e del 16 - 21%, rispettivamente. Nelle altre specie i lipidi neutri variano dal 6% di *D. salina* CCAP19/18 al 29% di *P. tricornutum* CCMP 632, mentre risulta più abbondante la frazione costituita dai glicolipidi. *D. brightwelli* CCMP 358 risulta essere un'eccezione in quanto caratterizzata dalla completa assenza di lipidi neutri (Tabella II.6).

II.3.5. Composizione degli acidi grassi totali

Le proprietà chimico-fisiche del biodiesel sono determinate dagli acidi grassi che lo costituiscono. Per determinarne la composizione in maniera rapida è stata utilizzata per la prima volta la Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) che consente la quantificazione diretta della componente insatura presente in un estratto lipidico, come descritto nel paragrafo II.2.7.

Le microalghe considerate in questo lavoro di tesi hanno un livello di acidi grassi saturi variabile dal 8.5% di *D. tertiolecta* CCMP 1320 al 72% di *P. pseudodelicatissima* B317 (Tabella II.7).

I tre strain di *T. weissflogii* e *C. cryptica* CCMP 331 presentano un contenuto di acidi grassi saturi compreso fra il 35% e il 50% e queste percentuali le rendono le diatomee più promettenti per la produzione di biodiesel, in quanto gli acidi grassi saturi per la produzione di

biodiesel sono quelli che presentano le caratteristiche più simili al diesel di origine fossile (Chisti, 2007; Hu et al., 2008).

Tabella II.7 – Percentuale di acidi grassi saturi e insaturi costituente l’estratto lipidico totale delle 21 microalghe

N°	Microalga	% saturi	% insaturi
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	29.0	71.0
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	33.1	66.9
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	33.9	66.1
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	21.3	78.7
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	26.7	73.3
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	35.7	64.3
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	38.0	62.0
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	42.0	58.0
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	52.3	47.7
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	50.2	49.8
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	53.9	46.1
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	52.4	47.6
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	54.1	45.9
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	31.3	68.7
15	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	72.0	28.0
16	<i>Ditylum brightwelli</i> CCMP 358	24.7	75.3
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	21.7	78.3
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	18.5	81.5
19	<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	13.2	86.8
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	8.5	91.5
21	<i>Chlamydomonas sp</i> CCMP 222	30.9	69.1

I principali acidi grassi polinsaturi costituenti i lipidi complessi delle diatomee sono a 20 atomi di carbonio, in particolare C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3 , e a 16 atomi di carbonio, C16:3 ω 4 e C16:4 ω 1 (d’Ippolito et al., 2005; Fontana et al., 2007; Hu et al., 2008) come riportato in Tabella II.8 dall’analisi della composizione percentuale mediante GC-MS.

Tabella II.8 – Percentuale acidi grassi costituenti i lipidi complessi delle 21 microalghe

N°	Microalga	C14:0	C16:4	C16:3	C16:1	C16:0	C18:3	C18:2	C18:1	C18:0	C20:4	C20:5	C22:6
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	13.4	1.8	2.6	47.0	15.2			0.6	0.9	2.8	14.9	0.9
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	31.0		6.1	21.4	19.2				14.6		7.7	
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	12.1	3.2	6.2	27.1	21.3	2.5		2.7	4.1		19.9	0.9
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	14.3	3.4	9.6	2.7	8.7	17.7		0.6	0.5	1.3	39.3	1.9
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	7.3	2.1	5.9	23.2	18.0	15.6	1.0	0.7	1.2		23.7	1.4
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	3.0		9.0	51.0	16.3	0.4	0.3	0.2	1.4	2.5	14.3	1.7
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	5.5		11.3	51.9	14.9			1.6	1.0	11.5		2.4
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	2.2		9.6	48.0	19.1	0.2	0.4	0.6	2.1	2.3	13.4	2.1
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	10.6			48.1	10.9	6.8		3.4	0.6	16.4	0.6	2.6
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	3.7			55.6	21.5	5.0		4.2	0.5		8.4	1.1
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	13.2	2.8	16.8	28.6	9.2	3.9	0.7		1.0		22.2	1.6
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	6.0	9.1	10.8	28.8	8.5	5.5	1.2	0.8	1.5		25.7	2.2
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	3.9	1.9	5.2	23.2	21.9	3.9		6.3	1.2	13.8	17.7	1.0
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	5.3		9.0	40.2	16.2		1.4	1.2	2.5		22.0	2.2
15	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	2.8		7.0	33.0				7.0	2.0	2.9	45.4	
16	<i>Ditylum brightwellii</i> CCMP 358	7.1		8.9	32.2	10.2	16.5			21.7		3.4	
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	6.6	10.4	39.0		15.0			9.2	5.9	13.9		
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	3.4	0.5		33.4	30.0		2.1	7.4	1.2	1.4	20.5	
19	<i>Dunaliella salina</i> CCAP19/18		17.3	1.6	1.0	16.9		4.8	45.7	12.7			
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320			16.2	6.0	18.1	3.7		55.3	0.7			
21	<i>Chlamydomonas</i> sp CCMP 222			29.0		18.3			43.8	8.8			

II.3.6. Parametri tecnici delle crescite microalgali

Le crescite delle 21 microalghe sono state effettuate in acqua di mare autoclavata che ha ridotto i rischi di contaminazioni biologiche e ha

reso più riproducibili le condizioni di crescita. Tuttavia, questa strada sarebbe impossibile nei cicli produttivi industriali che richiedono l'utilizzo di milioni di litri di acqua. La necessità di coltivazione su larga scala con acqua di mare non autoclavata presenta problemi associati alla presenza di spore o organismi microscopici, quali ciliati e batteri, che potrebbero impedire la crescita o ridurre la produttività della microalga. È importante quindi valutare e considerare la resistenza alle contaminazioni durante le varie fasi della crescita.

Tabella II.9 – Parametri tecnici delle 21 microalghe [- assente; + bassa; ++ media; +++ alta]

N°	Microalga	Resistenza alle contaminazioni	Capacità di sedimentare (h)
1	<i>Chaetoceros curvisetus</i> CCMP 3260	-	-
2	<i>Chaetoceros socialis</i> CCMP 3263	-	-
3	<i>Chaetoceros affinis</i> CCMP 3259	-	-
4	<i>Thalassiosira rotula</i> TR1 CCMP 1647	-	10
5	<i>Thalassiosira rotula</i> TR2 CCMP 3264	-	11
6	<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	+++	4
7	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1010	+++	4
8	<i>Thalassiosira weissflogii</i> CCMP 1336	+++	5
9	<i>Thalassiosira pseudonana</i> CCMP 1335	+	-
10	<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	+++	0.5
11	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe7 CCMP 2092	+	15
12	<i>Skeletonema marinoi</i> Fe6 CCMP 2092	+	12
13	<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	+++	-
14	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> CCMP 632	++	-
15	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i> B317	-	-
16	<i>Ditylum brightwelli</i> CCMP 358	-	-
17	<i>Melosira octogona</i> CCMP 483	-	-
18	<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	+++	-
19	<i>Dunaliella salina</i> CCAP 19/18	+++	-
20	<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCMP 1320	+++	-
21	<i>Chlamydomonas</i> sp CCMP 222	++	-

Come riportato in Tabella II.9, tra i 21 strain studiati, molte microalghe hanno subito contaminazioni. Solo i tre strain di *T. weissflogii*, *C. cryptica* CCMP 331, *C. fusiformis* CCMP 343 e tutte le microalghe verdi hanno dimostrato di essere molto resistenti alle contaminazioni (Tabella II.9), dimostrandosi in grado di riprodurre in acqua di mare non sterile le stesse curve di crescita ottenute in condizioni di sterilità controllata.

Un altro importante criterio nella selezione della specie nella produzione di biodiesel è la facilità di recupero della biomassa. In particolare in questo lavoro di tesi è stato preso in considerazione la capacità naturale di sedimentazione. Le diatomee sono costituite da frustuli di silice che permettono la sedimentazione spontanea nel giro di poche ore, mentre le microalghe verdi non presentano questo vantaggio biotecnologico.

Fra le diatomee solo i tre strain di *T. weissflogii*, i due strain di *T. rotula*, i due strain di *S. marinoi* e *C. cryptica* CCMP 331 sono capaci di sedimentare nel giro di 5 ore e questo è sicuramente una caratteristica di alto valore aggiunto per la riduzione dei costi di produzione del biodiesel (Tabella II.9).

II.3.7. Analisi statistica multivariata

Queste variabili biologiche hanno unità di misura e ordini di grandezza differenti: la produttività lipidica varia da 0.2 a 9.7 mg/L/giorno, mentre i lipidi neutri variano da 0 a 100%.

Per poter paragonare queste variabili con caratteristiche così differenti è stato applicato ad ogni valore preso in considerazione il “range scaling method”:

$$X \text{ misurato} - X_{\text{medio}} / X_{\text{max}} - X_{\text{min}}$$

La differenza fra il valore misurato e quello medio viene divisa per la differenza tra il valore massimo e quello minimo di ogni variabile (range) con lo scopo di dare un peso comparabile ad ogni parametro preso in considerazione nello screening microalgale e di mettere tutte le variabili sullo stesso piano (Smilde et al., 2004).

Nell’analisi multivariata abbiamo applicato l’Analisi della Componente Principale (PCA), che decompone i dati originali (parametri biologici) e gli oggetti del progetto (le specie prese in considerazione nello screening microalgale) in un nuovo spazio tridimensionale chiamato “score plot” (Figura II.7); la posizione di ogni specie è determinata dalla variazione dei parametri nel “loadings plot” (Figura II.8). Dallo studio del “loadings plot” è possibile capire come i diversi parametri biologici contribuiscono alla costruzione del modello statistico a due componenti (chiamate $t[1]$ e $t[2]$) in cui sono raggruppate le diverse specie. La significatività di questo modello statistico è del 79.42%.

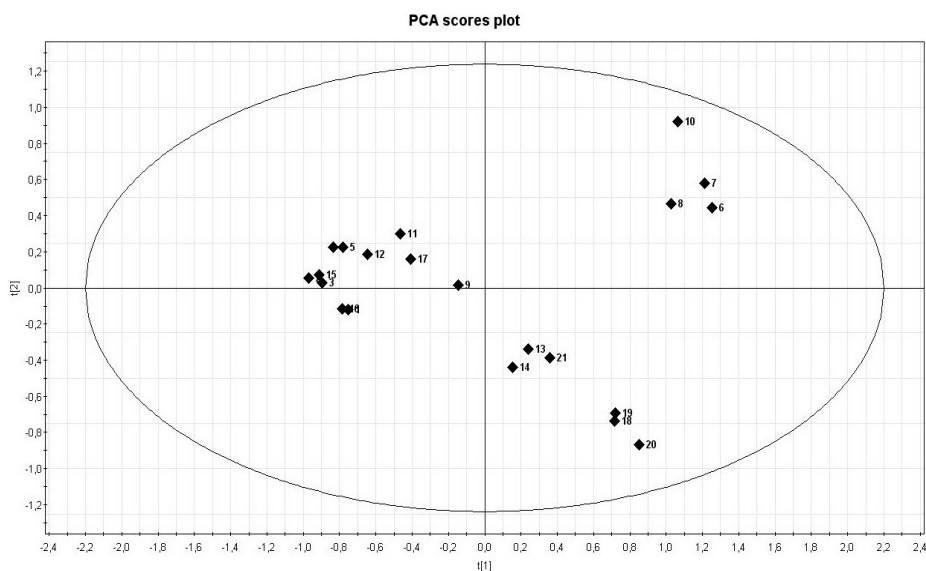


Figura II.7 - PCA “score plot” che mostra la distribuzione delle microalghe in un modello statistico a due componenti (t[1] e t[2])

Nello “score plot” (Figura II.7) t[1] e t[2] sono, rispettivamente, la prima e la seconda componente principale. Questo grafico mostra chiaramente tre raggruppamenti ben definiti per le 21 microalghe analizzate: il primo gruppo (specie 6, 7, 8 e 10) risulta essere molto separato dagli altri e si trova nel primo quadrante del grafico (dove le due componenti t[1] e t[2] sono positive); il secondo gruppo (specie 13, 14, 18, 19, 20 e 21) è posizionato nel quarto quadrante (dove t[1] è positiva e t[2] è negativa); il terzo gruppo (specie 1, 2, 3, 4, 5, 9, 11, 12, 15, 16 e 17) è principalmente collocato nel secondo quadrante (dove t[1] è negativa e t[2] è positiva).

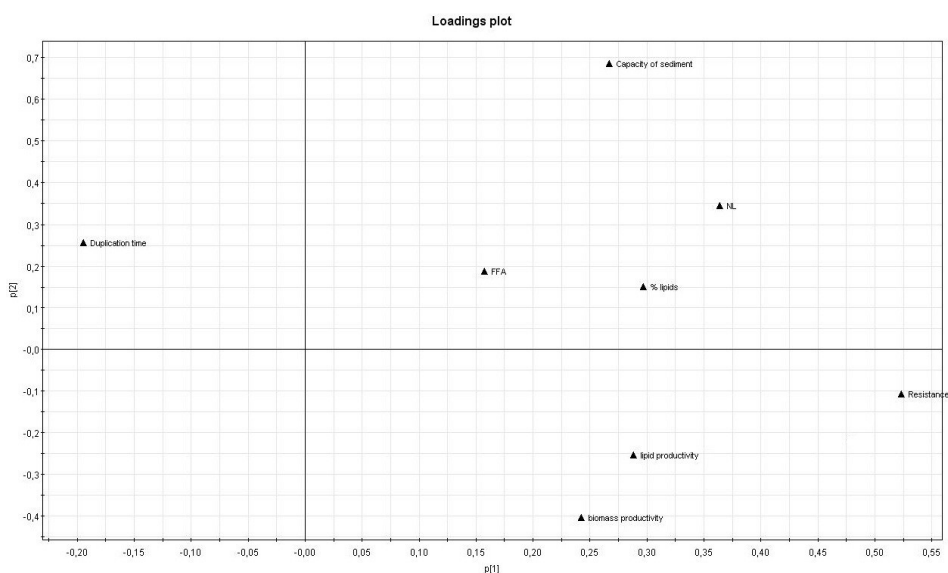


Figura II.8 – “Loadings plot” dei parametri biologici responsabili dei raggruppamenti delle specie microalgali nello “score plot”

Il corrispondente “loadings plot” (Figura II.8) mostra le componenti biologiche che hanno determinato i differenti gruppi formatisi nello “score plot”.

In particolare il primo gruppo, costituito dalle specie 6, 7, 8 e 10 che corrispondono alle tre *T. weissflogii* e a *C. cryptica* CCMP 331, è caratterizzato da una elevata percentuale lipidica, alta quantità di lipidi neutri, bassa produzione di acidi grassi liberi e una elevata capacità di sedimentare spontaneamente. Il secondo gruppo è fortemente influenzato da elevate produttività lipidica e in termini di biomassa e dalla resistenza alle contaminazioni. A questo gruppo appartengono le due diatomee pennate *C. fusiformis* CCMP 343 e *P. tricornutum* CCMP 632 e tutte le microalghe verdi oggetto di studio. Il terzo gruppo presenta alti tempi di duplicazione ed è rappresentato da tutte le altre diatomee centriche considerate nello screening.

La prima componente orizzontale $p[1]$ separa le specie migliori e peggiori. Il terzo gruppo possiede un parametro biologico più alto rispetto alla media, mentre gli altri due gruppi sono caratterizzati da più valori positivi che tendono al valore massimo. La seconda componente verticale $p[2]$ non risulta essere rilevante per il terzo gruppo ma è importante in quanto opera la separazione fra il gruppo 1 e 2. Poiché il primo gruppo (specie 6, 7, 8 e 10) è caratterizzato da alti valori sia di $p[1]$ che di $p[2]$, i tre strains di *T. weissflogii* e *C. cryptica* CCMP 331 che cadono in questo raggruppamento, hanno un numero maggiori di caratteristiche biologiche positive.

II.4. Conclusioni

La produttività lipidica è senza dubbio il parametro più importante da considerare nella selezione della microalga per la produzione di bioenergie. Altri parametri tecnici e caratteristiche genetiche delle microalghe devono essere presi in considerazione nella crescita della microalga in larga scala, come ad esempio la composizione in termini di acidi grassi, la distribuzione dei lipidi complessi nelle varie classi lipidiche, la presenza di acidi grassi liberi nell'estratto lipidico totale, la resistenza alle contaminazioni e la capacità di sedimentare. È chiaro che non è possibile trovare la specie microalgale ideale ma in uno screening è importante scegliere il miglior assortimento di tutti questi parametri.

Analizzando tutti i parametri biochimici e tecnologici delle 21 microalghe oggetto di questo lavoro di tesi dottorale, è stato possibile

scegliere i tre strain di *T. weissflogii* e *C. cryptica* CCMP 331 come le migliori microalghe da utilizzare come specie per la produzione di biocarburanti. Queste diatomee posseggono un'alta produttività lipidica e, allo stesso tempo, i migliori parametri tecnologici e fisiologici per una crescita in fotobioreattore.

CAPITOLO III

CRESCITE INDOOR IN FOTOBIOREATTORI

III.1. Introduzione

La produzione di energia da microalghe, e in particolare da diatomee, prevede necessariamente la coltura in modo intensivo delle specie selezionate nel Capitolo II di questa tesi dottorale. Le colture in fotobioreattori sono fondamentali per ottenere grandi quantità di biomassa per un'importante produzione di biodiesel (frazione lipidica) e di biogas (frazione glucidica).

Molto diffuse sono le colture in fotobioreattore sia all'interno con luce artificiale sia all'esterno di microalghe verdi (Boussiba et al., 1987; Garcia et al., 2003; Gouveia et al., 2009; Kong et al., 2009; Paul et al., 2009; Rodolfi et al., 2009). Sono state effettuate anche crescite su larga scala della diatomea bentonica *Phaeodactylum tricornutum* (Acien-Fernandez et al., 2003; Silva-Aciares et al., 2008).

In base alle indicazioni descritte nel capitolo II, sono state eseguite colture in fotobioreattori da 60 litri con *Thalassiosira weissflogii* P09 e *Cyclotella cryptica* CCMP 331. La discussione riportata di seguito descrive per la prima volta i risultati sistematici su produzioni intensive di diatomee centriche per la produzione di biocarburanti.

III.2. Materiali e metodi

III.2.1. Le microalghe selezionate

Lo studio è stato condotto comparando le produzioni (in biomassa, lipidi, proteine e carboidrati) in fotobioreattore delle due diatomee centriche (*T. weissflogii* P09 e *C. cryptica* CCMP 331) con quelle di una diatomea pennata (*C. fusiformis* CCMP 343) e di una microalga verde *N. salina* CCMP 369, specie frequentemente utilizzata in questo tipo di studi biotecnologici (Boussiba et al., 1987; Gouveia et al., 2009; Rodolfi et al., 2009).

III.2.2. I fotobioreattori

Per le colture su larga scala sono stati utilizzati tre fotobioreattori diversi con miscelazione ad *air lift*: due fotobioreattori verticali coassiali e un fotobioreattore inclinato, tutti realizzati in polimetilmetacrilato (PMMA) ad alta trasparenza dalla M2M Engineering s.r.l. (Figura III.1).

I due fotobioreattori verticali coassiali (o anulari) sono costituiti da due cilindri concentrici dell'altezza di 1 m. Il volume di coltura risulta essere pari a 50 litri e lo spessore dell'intercapedine fra i due cilindri concentrici è di 5 cm. Entrambi sono dotati di illuminazione interna e l'intensità della luce incidente sulla superficie interna è pari 350 - 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

I due sistemi coassiali differiscono fra loro solo per il tipo di insufflazione dell'aria che consente il flusso di miscelazione della

coltura. Il primo fotobioreattore (coassiale tradizionale) possiede un'insufflazione con bolle d'aria macroscopiche di dimensioni variabili da 0.5 a 3.0 cm; l'altro (coassiale con microinsufflazione) è caratterizzato da un'insufflazione a bolle microscopiche di dimensioni paragonabili a quelle delle cellule microalgali, con dimensioni di poche centinaia di micron (brevetto Neotica s.r.l. e M2M Engineering s.r.l. RM2010/A000297).



Figura III.1 – I tre fotobioreattori utilizzati in questo lavoro di tesi: a sinistra il fotobioreattore coassiale tradizionale, al centro il fotobioreattore coassiale con microinsufflazione e a destra il fotobioreattore inclinato

Il fotobioreattore inclinato (brevetto Neotica s.r.l. e M2M Engineering s.r.l. WO/2011/007250) è un cilindro con diametro di 20 cm e lunghezza di 2 m. Il volume netto di coltura risulta essere di 60 litri e

l'angolazione è di 45°. L'impianto di illuminazione artificiale è costituito da un concentratore parabolico assiale che fornisce un'intensità luminosa di 350 - 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sulla superficie incidente del cilindro inclinato. L'aria prevede la combinazione sinergica di due tipi di insufflazione: quella a bolle macroscopiche e quella a bolle microscopiche di dimensioni paragonabili alle dimensioni delle cellule in coltura. Questo fotobioreattore è equipaggiato con sonde per il monitoraggio continuo di pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e livello di O_2 disciolto (mg/L) nel mezzo di coltura, nonché i livelli di CO_2 ed NO_x .

III.2.3. Condizioni di crescita delle microalghe nei fotobioreattori

In tutti e tre i fotobioreattori tutte le crescite microalgali sono state sottoposte ad un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 ore di buio, alla temperatura di 20 ± 5 $^{\circ}\text{C}$ e un pH compreso tra 8 e 9.

Tutte le colture sono state effettuate in fotobioreattore in acqua di mare proveniente dal Golfo di Napoli (salinità circa 40 g/L, misurata utilizzando un rifrattometro ATC 106) e filtrata mediante filtri Millipore con pori del diametro di 1 μm .

L'acqua di mare utilizzata per le crescite in fotobioreattore non è stata autoclavata ed è stata arricchita con le soluzioni stock dei nutrienti del medium di crescita f/2 (Guillard et al., 1962), come riportato nel capitolo II, paragrafo II.2.1.:

- ☞ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O} = 30 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 883 μM).
- ☞ $\text{NaNO}_3 = 75 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 107 μM).
- ☞ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 5 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 36.3 μM).
- ☞ Soluzione oligoelementi (1 mL/L) contenente (g/L): Na_2EDTA 4.36 (concentrazione finale 11.7 μM) , $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 3.15 (concentrazione finale 11.7 μM), $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0.18, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.022, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.006.
- ☞ Vitamine (mg/L): biotina 0.5, cobalamina 0.5 e tiamina-HCl 100.0.

Na_2SiO_3 è stato aggiunto solo alle colture delle diatomee, in quanto fondamentale per la crescita di queste microalghe e in particolare per la formazione dei frustuli delle teche.

Per controllare il pH durante le fasi della crescita, è stato usato come tampone il Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 400 mM pH 7.8 (5 mL/L, concentrazione finale 2 mM).

Quotidianamente in ogni coltura in fotobioreattore sono stati aggiunti i nutrienti del medium f/2 a concentrazioni finali pari alla metà di quelle riportate in precedenza in quanto l'eccessiva presenza di nutrienti nel medium di crescita può alterare la crescita fisiologica microalgale e alcune vie metaboliche, in particolare la biosintesi dei lipidi (Terry, 1982; Rodolfi et al. 2009; Pahl et al., 2010).

III.2.4. Preparazione degli inoculi per i fotobioreattori

Le colture microalgali utilizzate come inoculi per i fotobioreattori sono state cresciute in carboy autoclavabili in polipropilene e policarbonato da 10 litri contenenti 5 litri di acqua di mare.

L'acqua di mare è stata filtrata 0.22 μm ed autoclavata, i nutrienti per il medium f/2 (capitolo II, paragrafo II.2.3.) sono stati sterilizzati mediante autoclave. Le colture sono state esposte a luce artificiale con un'intensità luminosa pari a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e con un ciclo giornaliero di luce di 14 ore (e 10 ore di buio), alla temperatura di 20 ± 2 °C e con insufflazione d'aria costante. Queste colture quando hanno raggiunto la fase esponenziale di crescita sono state utilizzate come inoculo per la crescita su larga scala.

III.2.5. Parametri controllati durante le crescite microalgali in fotobioreattore

La crescita cellulare è stata monitorata mediante conta cellulare quotidiana con camera di Bürker e osservazione della morfologia utilizzando un microscopio ottico a contrasto di fase (Nikon Eclipse E400) con un ingrandimento di 20 X. La concentrazione di cellule per mL (cells/mL) è stata determinata dal seguente calcolo:

$$\text{cells/mL} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

Ogni giorno è stato prelevato un litro di coltura e centrifugato a 2300 g (Allegra X12R - Beckman Coulter) per 10 minuti (per le diatomee) e

per 15 minuti (per le microalghe verdi) a 8 - 10 °C e il pellet così ottenuto è diviso in tre parti per effettuare le seguenti analisi:

- ☞ determinazione del contenuto proteico (capitolo II, paragrafo II.2.4.);
- ☞ determinazione del contenuto di carboidrati intracellulari (capitolo II, paragrafo II.2.5.);
- ☞ determinazione del contenuto lipidico (capitolo II, paragrafo II.2.6.).

Il peso secco è stato stimato dopo aver lavato il pellet cellulare con formato di ammonio 0.5 M per rimuovere i sali dell'acqua di mare e del medium di crescita (Zhu et al., 1997). Il pellet microalgale così ottenuto è liofilizzato in modo tale da poter determinare il peso secco della biomassa.

Le crescite effettuate sui tre fotobioreattori non sono crescite in continuo in quanto ogni giorno vengono solo aggiunti i nutrienti del medium f/2 e non ulteriore acqua di mare per sostituire il litro di coltura prelevato per monitorare la crescita.

III.2.6. Raccolta finale della biomassa

Alla fine della fase di crescita, l'interno volume di crescita microalgale presente all'interno dei fotobioreattori è stato centrifugato mediante una centrifuga a flusso tangenziale, realizzata appositamente dalla M2M Engineering s.r.l.

La velocità di centrifuga è stata di 6600 g e la coltura cellulare stata caricata all'interno della centrifuga utilizzando una pompa peristaltica a 110 g/minuto.

III.2.7. Tempi di duplicazione

La divisione cellulare è stata espressa considerando il tempo di duplicazione (dt):

$$dt = (t_2 - t_1) \times \ln 2 / (\ln N_2 / N_1)$$

dove N_1 e N_2 sono il numero di cellule (cells/mL) al tempo t_1 (inizio della curva di crescita e t_2 (punto massimo della curva di crescita).

III.3. Risultati e discussione

I dati ottenuti (biomassa, lipidi, proteine e carboidrati) sono superiori a quelli ottenuti durante lo screening delle microalghe effettuato per questo lavoro di tesi (capitolo II), in quanto la geometria dei fotobioreattori e il tipo di illuminazione e di insufflazione tendono a migliorare le condizioni delle crescite cellulari ottenute in carboy e consentono di ottenere rese (mg/L), produttività (mg/L/ giorno) e concentrazioni cellulari molto più elevate.

III.3.1. *Nannochloropsis salina* CCMP 369: curve di crescita e biomassa

Le crescite di *N. salina* CCMP 369 nei tre differenti fotobioreattori sono state effettuate in triplicato (n=3).

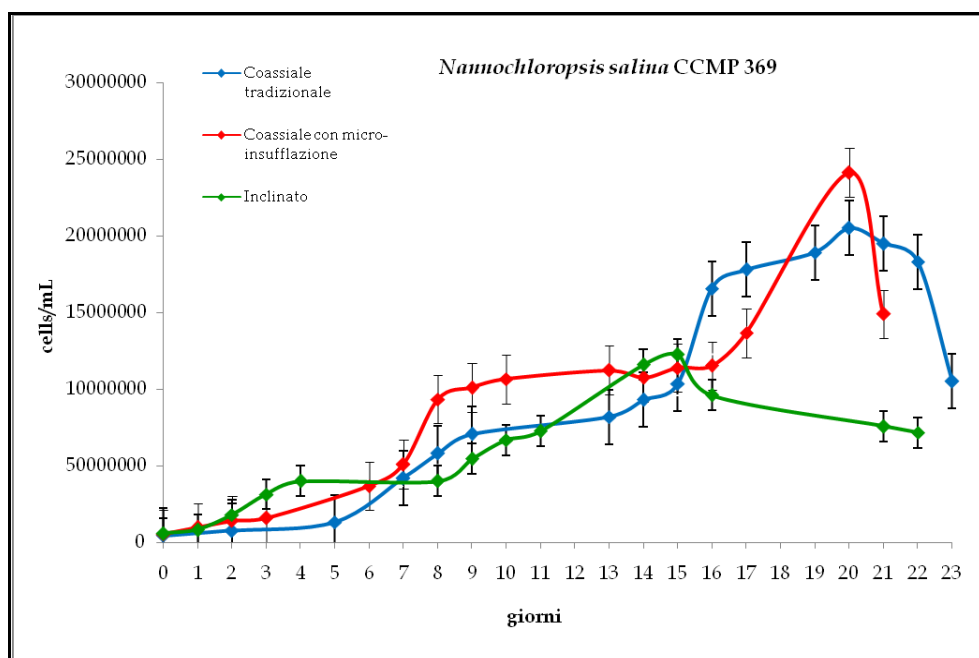


Figura III.2 – Curve di crescita di *Nannochloropsis salina* CCMP 369 nei tre fotobioreattori (n=3)

La Figura III.2 mostra l'andamento delle crescite di *N. salina* CCMP 369 nei diversi fotobioreattori, determinata mediante il conteggio al microscopio del numero di cellule per unità di volume (paragrafo III.2.5.). Dall'analisi delle curve di crescita sembra che non vi è alcuna differenza se la microalga verde è cresciuta in un fotobioreattore coassiale tradizionale o in un coassiale con micro-insufflazione.

Tabella III.1 – Giorni di crescita, tempi di duplicazione, resa in biomassa (mg/L) e produttività in biomassa (mg/L/giorno) nel punto di fase stazionaria di *Nannochloropsis salina* CCMP 369 nei tre fotobioreattori (n=3)

<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	Giorni di crescita	Tempo di duplicazione (h)	Biomassa (mg/L)	Produttività biomassa (mg/L/giorno)
Coassiale tradizionale	21.7 ± 2.1	91.8 ± 6.0	1310.95 ± 216.52	60.31 ± 5.16
Coassiale con micro-insufflazione	24.5 ± 6.4	104.6 ± 24.4	1568.18 ± 224.99	65.01 ± 7.70
Inclinato	14.5 ± 0.7	77.2 ± 0.8	349.51 ± 24.38	25.97 ± 3.17

I tempi di duplicazione della microalga verde sono paragonabili nei due coassiali e le biomasse prodotte nella fase stazionaria della curva di crescita raggiungono 1.31 g/L nel coassiale tradizionale e 1.57 g/L nel coassiale con micro-insufflazione (Tabella III.1).

Le produttività in biomassa (mg/L/giorno) risultano essere maggiori quando *N. salina* CCMP 369 è cresciuta nel coassiale con micro-insufflazione (65.01 ± 7.70 mg/L/giorno) rispetto alla crescita effettuata nel coassiale tradizionale (60.31 ± 5.16 mg/L/giorno) e questo lieve incremento indica che la crescita della microalga verde è influenzata positivamente dal tipo di insufflazione e in particolare dalle dimensioni ridotte delle bolle d'aria (Tabella III.1).

Per quanto riguarda il fotobioreattore inclinato, la curva di crescita di *N. salina* CCMP 369 è peggiore in termini di cells/mL e il peso secco in biomassa prodotta risulta essere inferiore, diminuendo fino a 0.35 g/L. Anche la produttività in biomassa è drasticamente inferiore scendendo fino a 25.97 ± 3.17 mg/L/giorno (Tabella III.1).

Le concentrazioni cellulari elevate raggiunte da questa microalga non sono adatte alla geometria del fotobioreattore inclinato e al tipo di illuminazione con parabola esterna: l'effetto ombra delle cellule influenza negativamente la produttività in termini di biomassa e quindi la produzione di biocarburanti.

III.3.2. *Nannochloropsis salina* CCMP 369: lipidi, proteine e carboidrati

In tutti e tre i fotobioreattori la microalga verde *N. salina* CCMP 369 mostra una resa in biomassa (mg/L) maggiore nel primo punto della fase senescente, anche se il numero di cellule per unità di volume (cells/mL) risulta essere inferiore rispetto alla fase stazionaria (Tabelle III.2, III.3 e III.4). In questa fase della crescita la biomassa risulta essere maggiore perché costituita oltre che dalle cellule vitali (cells/mL) da detriti cellulari che però non contribuiscono alla conta cellulare. La fase esponenziale della curva di crescita corrisponde alla fase del ciclo vitale in cui si ha la massima velocità di crescita e di produzione di biomassa.

Il contenuto lipidico (mg/L) di *N. salina* CCMP 369 risulta essere massimo in fase stazionaria in tutti e tre i fotobioreattori, mentre si ha una diminuzione in fase senescente, indicando che i lipidi vengono sintetizzati e accumulati durante la fase esponenziale e in quella stazionaria. Nel fotobioreattore coassiale tradizionale e in quello con micro-insufflazione si ottengono rese paragonabili, rispettivamente di 185.04 ± 14.17 mg/L e di 177.95 ± 13.02 mg/L (Tabelle III.2, III.3 e

III.4). Nel fotobioreattore inclinato la quantità di lipidi prodotta risulta essere di 81.01 ± 5.61 mg/L e questa diminuzione nella biosintesi è dovuta alla geometria poco favorevole del fotobioreattore inclinato e al tipo di illuminazione che non permette una sufficiente quantità di luce per le cellule che raggiungono alte densità cellulari come nel caso di *N. salina* CCMP 369.

Tabella III.2 – Parametri monitorati durante la crescita di *Nannochloropsis salina* CCMP 369 nel fotobioreattore coassiale tradizionale (n=3)

<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369 – Coassiale tradizionale	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	442.99 ± 61.22	738.18 ± 175.97	1155.60 ± 115.18	1310.95 ± 216.52	1577.12 ± 279.94
Lipidi (mg/L)	35.72 ± 11.33	60.45 ± 14.84	111.95 ± 29.31	185.04 ± 14.17	158.75 ± 29.82
Proteine (mg/L)	29.69 ± 11.38	29.55 ± 12.30	37.94 ± 1.74	41.26 ± 0.94	52.70 ± 10.33
Carboidrati (mg/L)	10.32 ± 0.25	20.47 ± 8.95	22.61 ± 8.03	25.25 ± 8.27	24.30 ± 1.84

Tabella III.3 – Parametri monitorati durante la crescita di *Nannochloropsis salina* CCMP 369 nel fotobioreattore coassiale con micro-insufflazione (n=3)

<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369 – Coassiale con micro-insufflazione	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	335.85 ± 18.40	895.28 ± 35.76	1426 ± 249.09	1568.18 ± 224.99	1585.23 ± 216.95
Lipidi (mg/L)	53.30 ± 6.43	128.13 ± 19.37	173.58 ± 21.13	177.95 ± 13.02	148.75 ± 62.68
Proteine (mg/L)	39.00 ± 7.07	44.26 ± 6.02	37.55 ± 2.05	38.45 ± 9.24	54.64 ± 11.12
Carboidrati (mg/L)	14.50 ± 4.95	42.60 ± 10.75	85.75 ± 11.10	90.30 ± 7.21	70.80 ± 15.84

Tabella III.4 – Parametri monitorati durante la crescita di *Nannochloropsis salina* CCMP 369 nel fotobioreattore inclinato (n=3)

<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369 – Inclinato	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	119.03 ± 7.95	237.15 ± 15.25	263.17 ± 16.70	349.51 ± 24.38	424.52 ± 27.29
Lipidi (mg/L)	22.20 ± 2.67	41.37 ± 4.51	56.19 ± 3.13	81.01 ± 5.61	72.77 ± 10.67
Proteine (mg/L)	30.29 ± 9.04	41.41 ± 3.61	42.06 ± 5.83	44.31 ± 11.67	40.02 ± 4.84
Carboidrati (mg/L)	1.95 ± 0.55	4.23 ± 0.77	6.02 ± 1.37	6.99 ± 2.07	5.77 ± 1.42

Il contenuto proteico rimane sempre costante lungo le varie fasi delle curve di crescita e non vi sono differenze fra i tre fotobioreattori. In fase stazionaria la resa in proteine risulta essere di 41.26 ± 0.94 mg/L nel coassiale tradizionale, di 38.45 ± 9.24 mg/L nel coassiale con micro-insufflazione e di 44.31 ± 11.67 mg/L nell'inclinato (Tabelle III.2, III.3 e III.4).

Analizzando la frazione glucidica di *N. salina* CCMP 369, i valori massimi vengono raggiunti sempre in fase stazionaria: nel fotobioreattore coassiale con micro-insufflazione la resa è di 90.30 ± 7.21 mg/L, mentre nel fotobioreattore coassiale tradizionale è di 25.25 ± 8.27 mg/L e nell'inclinato è di 6.99 ± 2.07 mg/L (Tabelle III.2, III.3 e III.4). Le dimensioni microscopiche delle bolle favoriscono il metabolismo dei carboidrati, migliorando le caratteristiche della biomassa che, oltre per la produzione di biodiesel (frazione lipidica), può essere utilizzata per la produzione di biometano e bioidrogeno.

Alla microalga verde *N. salina* CCMP 369, molto diffusa in letteratura per la crescita su larga scala per la produzione di biocarburanti (Boussiba et al., 1987; Gouveia et al., 2009; Rodolfi et al., 2009), sono

state paragonate la diatomea pennata *C. fusiformis* CCMP 343 e le due diatomee centriche *C. cryptica* CCMP 331 e *T. weissflogii* P09, con lo scopo di dimostrare che queste specie sono adatte e competitive per la produzione di biocarburanti su larga scala.

III.3.3. *Cylindrotheca fusiformis* CCMP 343: curve di crescita e biomassa

Le crescite di *C. fusiformis* CCMP 343 nei tre differenti fotobioreattori sono state effettuate in triplicato (n=3).

La Figura III.3 mostra l'andamento delle crescite di *C. fusiformis* CCMP 343 nei diversi fotobioreattori, determinata mediante il conteggio al microscopio del numero di cellule per unità di volume (paragrafo III.2.5.). Le diatomee pennate sono bentoniche e hanno come caratteristica principale quella di crescere e di aderire sulle superfici che le circondano. Analizzando le curve di crescita il risultato migliore, in termini di conteggio cellulare (cells/mL), è stato ottenuto utilizzando il fotobioreattore con micro-insufflazione che, sembra non permettere alla diatomea pennata di aderire alle pareti del fotobioreattore stesso. Le cellule, rimanendo in soluzione nel medium di crescita, contribuiscono ad aumentare il numero di cellule della curva di crescita.

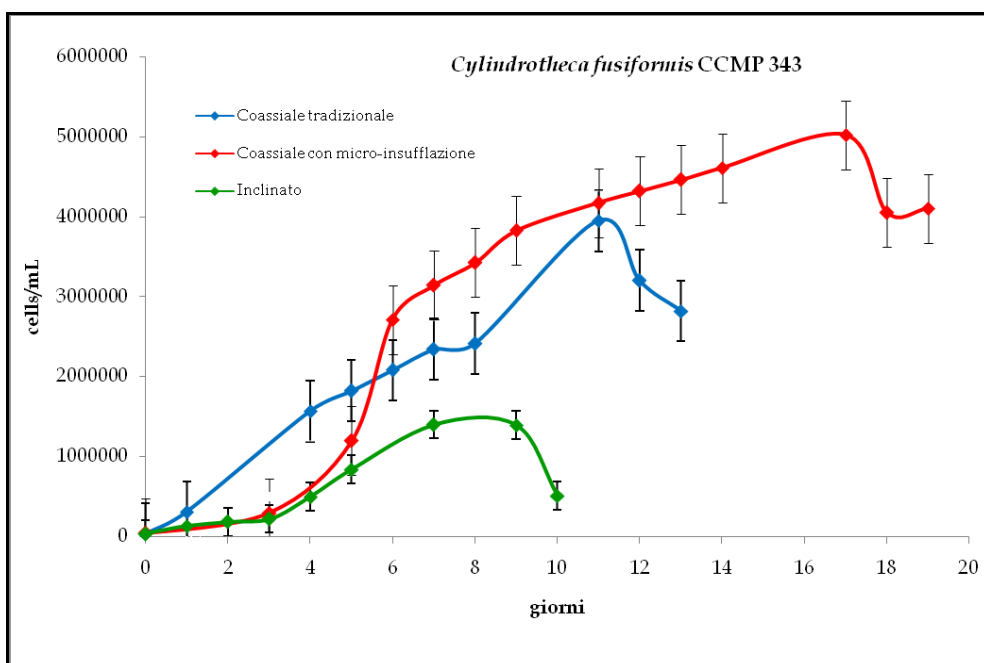


Figura III.3 – Curve di crescita di *Cylandrotheca fusiformis* CCMP 343 nei tre fotobioreattori (n=3)

Tabella III.5 – Giorni di crescita, tempi di duplicazione, resa in biomassa (mg/L) e produttività in biomassa (mg/L/giorno) nel punto di fase stazionaria di *Cylandrotheca fusiformis* CCMP 343 nei tre fotobioreattori (n=3)

<i>Cylandrotheca fusiformis</i> CCMP 343	Giorni di crescita	Tempo di duplicazione (h)	Biomassa (mg/L)	Produttività biomassa (mg/L/giorno)
Coassiale tradizionale	10.0 ± 1.4	36.0 ± 5.0	535.51 ± 51.51	53.72 ± 2.45
Coassiale con micro-insufflazione	15.5 ± 2.1	55.2 ± 5.5	798.52 ± 51.27	51.78 ± 3.78
Inclinato	8.0 ± 1.4	36.0 ± 5.9	176.56 ± 5.43	22.36 ± 3.27

Le curve di crescita nei tre fotobioreattori di *C. fusiformis* CCMP 343 hanno una durata inferiore (9 - 17 giorni; Tabella III.5) rispetto a quelle di *N. salina* CCMP 369 (14 - 29 giorni; paragrafo III.3.1., Tabella III.1).

Le biomasse prodotte in fase stazionaria della curva di crescita di *C. fusiformis* CCMP 343 riflettono il diverso andamento delle curve di crescita, raggiungendo 0.53 g/L nel coassiale tradizionale e 0.80 g/L nel coassiale con micro-insufflazione (Tabella III.5).

Le produttività (mg/L/giorno), invece, risultano essere identiche quando *C. fusiformis* CCMP 343 è cresciuta nel fotobioreattore coassiale con micro-insufflazione (51.78 ± 3.78 mg/L/giorno) e nel coassiale tradizionale (53.72 ± 2.45 mg/L/giorno), in quanto la curva di crescita nel coassiale tradizionale presenta una durata media inferiore (10 giorni) rispetto a quella ottenuta nel coassiale con micro-insufflazione (15.5 giorni), andando quindi a influenzare la produttività in biomassa.

Per quanto riguarda il fotobioreattore inclinato, la curva di crescita di *C. fusiformis* CCMP 343 risulta essere peggiore in termini di cells/mL e il peso secco in biomassa risulta essere inferiore, diminuendo fino a 0.18 g/L. Anche la produttività è drasticamente inferiore in questo fotobioreattore, scendendo fino a 22.36 ± 3.27 mg/L/giorno (Tabella III.5).

Il tipo differente di insufflazione dei due coassiali non sembra influenzare la produttività in biomassa di *C. fusiformis* CCMP 343. In realtà le concentrazioni cellulari elevate raggiunte non consentono alla micro-insufflazione di evitare l'adesione della diatomea pennata al fotobioreattore e questo determina una diminuzione della biomassa prodotta e una sottostima del numero di cellule effettive della curva di crescita. La geometria del fotobioreattore inclinato e il tipo di illuminazione esterna favoriscono ulteriormente l'adesione cellulare e

l'effetto ombra, influenzando negativamente la produttività in termini di biomassa e quindi la produzione di biocarburanti.

III.3.4. *Cylindrotheca fusiformis* CCMP 343: lipidi, proteine e carboidrati

In tutti e tre i fotobioreattori la diatomea pennata *C. fusiformis* CCMP 343 mostra una resa in biomassa (mg/L) maggiore nel primo punto della fase senescente, anche se il numero di cellule per unità di volume (cells/mL) risulta essere inferiore rispetto alla fase stazionaria (Tabelle III.6, III.7 e III.8). In questa fase della crescita la biomassa risulta essere maggiore perché costituita oltre che dalle cellule vitali (cells/mL) anche da detriti cellulari che però non contribuiscono al numero di cellule per unità di volume.

Il contenuto di lipidi (mg/L) di *C. fusiformis* CCMP 343 risulta essere massimo in fase senescente in tutti e tre i fotobioreattori, indicando che in realtà la diminuzione nel numero di cellule è dovuto all'adesione cellulare e non al fatto che la diatomea si trova effettivamente in fase senescente. Nel coassiale tradizionale si ottiene una resa di 133.47 ± 13.26 mg/L e in quello con micro-insufflazione di 169.32 ± 64.28 mg/L (Tabelle III.6, III.7 e III.8), indicando un miglioramento con le bolle microscopiche nella biosintesi lipidica. Nel fotobioreattore inclinato la quantità di lipidi prodotta risulta essere di 29.13 ± 3.27 mg/L e questa diminuzione è dovuta alla minore quantità di biomassa prodotta. La geometria poco favorevole del fotobioreattore inclinato per questa diatomea, il tipo di illuminazione

e la tendenza naturale di *C. fusiformis* CCMP 343 ad aderire alle pareti determinano una diminuzione nella produttività in biomassa e, di conseguenza, in termini di lipidi.

Tabella III.6 – Parametri monitorati durante la crescita di *Cylindrotheca fusiformis* CCMP 343 nel fotobioreattore coassiale tradizionale (n=3)

<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343 – Coassiale tradizionale	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	392.10 ± 24.35	401.60 ± 36.37	416.99 ± 17.28	535.51 ± 51.51	650.80 ± 2.41
Lipidi (mg/L)	56.36 ± 14.62	59.63 ± 6.02	60.80 ± 6.11	103.24 ± 19.85	133.47 ± 13.26
Proteine (mg/L)	69.23 ± 4.56	72.58 ± 8.97	83.65 ± 10.96	129.45 ± 48.15	131.38 ± 33.76
Carboidrati (mg/L)	10.07 ± 5.42	17.92 ± 6.33	32.30 ± 5.23	43.35 ± 14.78	50.70 ± 5.23

Tabella III.7 – Parametri monitorati durante la crescita di *Cylindrotheca fusiformis* CCMP 343 nel fotobioreattore coassiale con micro-insufflazione (n=3)

<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343 – Coassiale con micro- insufflazione	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	265.11 ± 55.60	458.75 ± 8.84	634.66 ± 19.28	798.52 ± 51.27	1017.56 ± 4.10
Lipidi (mg/L)	35.00 ± 6.75	68.66 ± 7.07	107.44 ± 12.62	139.89 ± 28.12	169.32 ± 64.28
Proteine (mg/L)	66.30 ± 9.62	112.13 ± 16.44	148.89 ± 39.05	236.10 ± 19.66	246 ± 24.75
Carboidrati (mg/L)	31.75 ± 6.72	39.20 ± 4.53	82.80 ± 25.74	155.10 ± 9.05	193.70 ± 14.75

Tabella III.8 – Parametri monitorati durante la crescita di *Cylindrotheca fusiformis* CCMP 343 nel fotobioreattore inclinato (n=3)

<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343 – Inclinato	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	88.39 ± 7.37	99.35 ± 4.06	127.64 ± 13.05	176.56 ± 5.43	184.78 ± 12.39
Lipidi (mg/L)	14.42 ± 2.08	18.02 ± 1.86	22.68 ± 1.22	29.13 ± 3.27	31.99 ± 4.74
Proteine (mg/L)	5.95 ± 2.43	6.45 ± 2.50	8.44 ± 1.88	14.53 ± 3.96	15.74 ± 3.34
Carboidrati (mg/L)	7.27 ± 1.32	7.67 ± 1.60	8.99 ± 0.16	11.57 ± 1.09	12.93 ± 6.40

Il contenuto proteico maggiore risulta essere anche con questa specie nel punto di fase senescente: 131.38 ± 33.76 mg /L nel coassiale tradizionale, 246 ± 24.75 mg/L nel coassiale con micro-insufflazione e 15.74 ± 3.34 mg/L nel fotobioreattore inclinato (Tabelle III.6, III.7 e III.8).

Analizzando la componente di carboidrati interni di *C. fusiformis* CCMP 343, i valori massimi vengono raggiunti sempre in fase senescente: nel fotobioreattore coassiale con micro-insufflazione la resa è di 193.70 ± 14.75 mg/L, mentre nel coassiale tradizionale è di 50.70 ± 5.23 mg/L e nell'inclinato è di 12.93 ± 6.40 mg/L (Tabelle III.6, III.7e III.8).

Questi risultati ottenuti per le proteine e i carboidrati confermano ulteriormente quelli ottenuti per i lipidi: la particolare insufflazione del coassiale con micro-insufflazione fornisce condizioni migliori per la crescita della diatomea pennata *C. fusiformis* CCMP 343. Il contenuto più elevato in proteine e in carboidrati in fase senescente ottenuto in tutti e tre i fotobioreattori rispetto alla fase di massima crescita (stazionaria) ci porta a concludere che l'adesione cellulare al

fotobioreattore influisce negativamente sulla produzione di biomassa e di conseguenza anche delle proteine e dei carboidrati.

Analizzando tutti i dati ottenuti (biomassa, lipidi, proteine e carboidrati) con il fotobioreattore inclinato, si è arrivati alla conclusione che questo tipo di fotobioreattore è inadatto per la crescita delle diatomee pennate su larga scala per la produzione di bioenergie.

III.3.5. *Cyclotella cryptica* CCMP 331: curve di crescita e biomassa

Le crescite di *C. cryptica* CCMP 331 nei tre differenti fotobioreattori sono state effettuate in triplicato (n=3).

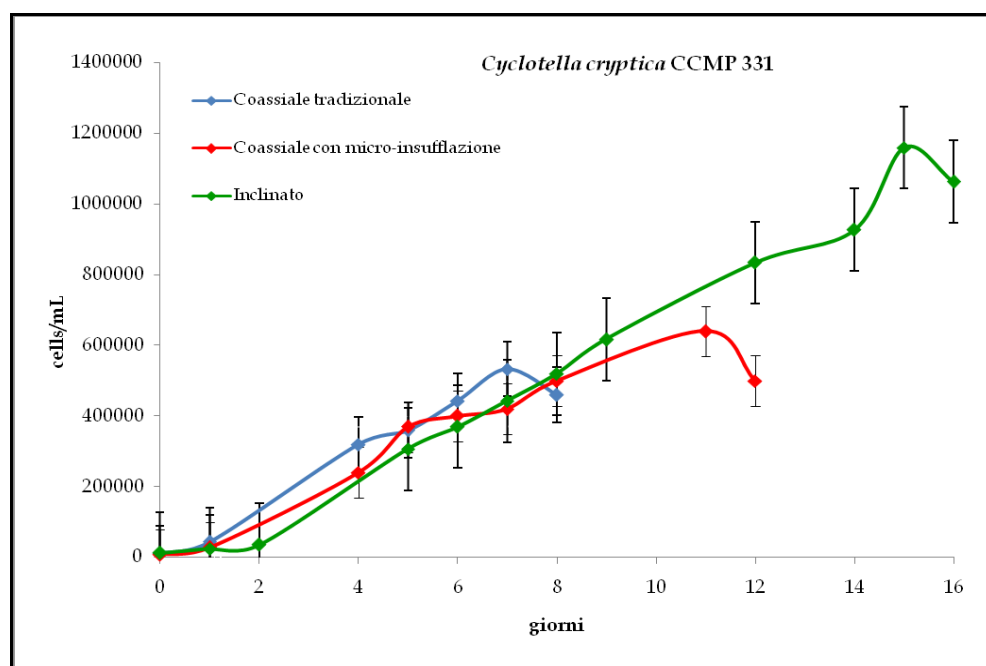


Figura III.4 - Curve di crescita di *Cyclotella cryptica* CCMP 343 nei tre fotobioreattori (n=3)

La Figura III.4 mostra l'andamento delle crescite di *C. cryptica* CCMP 331 nei diversi fotobioreattori, determinata mediante il conteggio cellulare al microscopio (paragrafo III.2.5.). Dall'analisi delle curve di crescita il risultato migliore in termini di cellule nell'unità di volume (cells/mL), è stato ottenuto utilizzando il fotobioreattore inclinato. Contrariamente a quanto evidenziato con la microalga verde *N. salina* CCMP 369 e con la diatomea pennata *C. fusiformis* CCMP 343, la crescita della diatomea centrica sembra essere favorita dalla geometria di questo fotobioreattore e dal tipo di insufflazione.

Tabella III.9 – Giorni di crescita, tempi di duplicazione, resa in biomassa (mg/L) e produttività in biomassa (mg/L/giorno) nel punto di fase stazionaria di *Cyclotella cryptica* CCMP 331 nei tre fotobioreattori (n=3)

<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	Giorni di crescita	Tempo di duplicazione (h)	Biomassa (mg/L)	Produttività biomassa (mg/L/giorno)
Coassiale tradizionale	7.0 ± 1.4	33.3 ± 4.5	870.29 ± 26.12	126.53 ± 21.83
Coassiale con micro- insufflazione	10.7 ± 0.6	42.4 ± 4.9	715.76 ± 142.18	66.80 ± 10.38
Inclinato	13.5 ± 2.1	52.8 ± 2.7	1206.70 ± 289.11	88.80 ± 7.46

Le curve di crescita nei tre fotobioreattori di *C. cryptica* CCMP 331 hanno una durata paragonabile (7 - 15 giorni; Tabella III.9) a quelle di *C. fusiformis* CCMP 343 (9 - 17 giorni; paragrafo III.3.3., Tabella III.5) ma inferiori rispetto a quelle di *N. salina* CCMP 369 (14 - 29 giorni; paragrafo III.3.1., Tabella III.1).

Le biomasse prodotte in fase stazionaria da *C. cryptica* CCMP 331 nei due fotobioreattori coassiali sono paragonabili, raggiungendo 0.87

g/L nel tradizionale e 0.71 g/L in quello con micro-insufflazione (Tabella III.9).

Le produttività (mg/L/giorno), invece, risultano essere maggiori quando *C. cryptica* CCMP 331 è cresciuta nel coassiale tradizionale (126.53 ± 21.83 mg/L/giorno) rispetto alla crescita effettuata nel coassiale con micro-insufflazione (66.80 ± 10.38 mg/L/giorno). La differente durata delle curva di crescita (Tabella III.9) tende a influenzare la produttività in biomassa.

Per quanto riguarda il fotobioreattore inclinato, la curva di crescita di *C. cryptica* CCMP 331 risulta essere migliore in termini di cells/mL e il peso secco in biomassa prodotta risulta essere maggiore, aumentando fino a 1.21 g/L. La produttività risulta essere di 88.80 ± 7.46 mg/L/giorno (Tabella III.9), essendo la durata media della curva di crescita di 13.5 giorni.

Il tipo differente di insufflazione dei due coassiali sembra influenzare la produttività in biomassa di *C. cryptica* CCMP 331. Le bolle macroscopiche del coassiale tradizionale sembrano favorire la quantità di biomassa prodotta ma in realtà, dalle osservazioni al microscopio, sono presenti molti detriti cellulari che fanno aumentare il peso secco ma non contribuiscono alla conta cellulare e quindi alla curva di crescita. Il fotobioreattore inclinato, con tutte le sue caratteristiche tecniche, migliora ulteriormente le condizioni fisiologiche per la crescita delle diatomee e la produttività in termini di biomassa.

III.3.6. *Cyclotella cryptica* CCMP 331: lipidi, proteine e carboidrati

La resa in biomassa (mg/L) in tutti e tre i fotobioreattori della diatomea centrica *C. cryptica* CCMP 331 risulta essere maggiore nel primo punto della fase senescente, anche se il numero di cellule per unità di volume (cells/mL) risulta essere inferiore rispetto alla fase stazionaria (Tabelle III.10, III.11 e III.12). In questa fase della crescita la biomassa risulta essere maggiore perché costituita oltre che dalle cellule vitali (cells/mL) anche da detriti cellulari che però non contribuiscono al numero di cellule per unità di volume.

Il contenuto di lipidi (mg/L) di *C. cryptica* CCMP 331 risulta essere massimo in fase stazionaria in tutti e tre i fotobioreattori. Nel coassiale tradizionale si ottiene una resa di 5.88 ± 1.50 mg/L, valore molto basso dovuto alle condizioni di stress create dalle bolle macroscopiche dell'insufflazione che non favoriscono la crescita della diatomea e determinano un'alterazione in negativo del contenuto lipidico. Nel coassiale con micro-insufflazione la resa è stata di 62.65 ± 20.74 mg/L (Tabelle III.10, III.11 e III.12), suggerendo un evidente miglioramento con le bolle microscopiche nella biosintesi lipidica. Nel fotobioreattore inclinato la quantità di lipidi prodotta risulta essere di 114.55 ± 18.00 mg/L, confermando che la geometria di questo fotobioreattore migliora la quantità di biomassa prodotta con le diatomee centriche ma soprattutto raddoppia la resa lipidica, fattore molto importante nella produzione di biodiesel.

Tabella III.10 – Parametri monitorati durante la crescita di *Cyclotella cryptica* CCMP 331 nel fotobioreattore coassiale tradizionale (n=3)

<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331 – Coassiale tradizionale	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	295.83 ± 27.43	609.90 ± 45.66	724.73 ± 11.68	870.29 ± 26.12	1149.03 ± 57.45
Lipidi (mg/L)	14.12 ± 1.91	8.68 ± 1.06	7.09 ± 2.53	5.88 ± 1.50	5.36 ± 2.01
Proteine (mg/L)	28.54 ± 5.50	37.39 ± 6.20	52.12 ± 4.70	54.12 ± 3.98	52.26 ± 10.24
Carboidrati (mg/L)	23.12 ± 4.21	27.35 ± 2.09	29.55 ± 6.06	35.34 ± 4.38	28.34 ± 2.82

Tabella III.11 – Parametri monitorati durante la crescita di *Cyclotella cryptica* CCMP 331 nel fotobioreattore coassiale con micro-insufflazione (n=3)

<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331 – Coassiale con micro-insufflazione	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	332.42 ± 37.24	506.70 ± 25.37	623.18 ± 99.39	715.76 ± 142.18	795.00 ± 135.51
Lipidi (mg/L)	42.31 ± 15.62	48.90 ± 15.93	52.05 ± 14.42	62.65 ± 20.74	56.97 ± 7.39
Proteine (mg/L)	53.37 ± 8.93	61.62 ± 13.00	75.75 ± 29.76	96.41 ± 29.19	94.23 ± 18.17
Carboidrati (mg/L)	17.90 ± 8.70	23.31 ± 10.45	23.98 ± 6.43	24.72 ± 9.24	20.49 ± 1.02

Tabella III.12 – Parametri monitorati durante la crescita di *Cyclotella cryptica* CCMP 331 nel fotobioreattore inclinato (n=3)

<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331 – Inclinato	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	465.11 ± 175.33	669.15 ± 228.60	987.44 ± 260.42	1206.70 ± 289.11	1235.57 ± 218.72
Lipidi (mg/L)	48.69 ± 12.94	52.61 ± 7.23	69.89 ± 6.75	114.55 ± 18.00	105.45 ± 2.57
Proteine (mg/L)	70.65 ± 41.58	79.65 ± 45.47	80.13 ± 32.70	116.36 ± 39.51	115.38 ± 19.83
Carboidrati (mg/L)	16.11 ± 4.40	26.18 ± 11.27	26.65 ± 12.16	28.35 ± 12.04	26.50 ± 14.52

Il contenuto proteico maggiore è stato ottenuto nel punto di fase stazionaria: 54.12 ± 3.98 mg /L nel coassiale tradizionale, 96.41 ± 29.19 mg/L nel coassiale con micro-insufflazione e 116.36 ± 39.51 mg/L nel fotobioreattore inclinato (Tabelle III.10, III.11 e III.12).

Per quanto riguarda la componente di carboidrati interna di *C.cryptica* CCMP 331, i valori massimi vengono raggiunti, anche in questo caso, in fase stazionaria: nel coassiale tradizionale la resa è di 35.34 ± 4.38 mg/L, mentre nel coassiale con micro-insufflazione è di 24.72 ± 9.24 mg/L e nell'inclinato è di 28.35 ± 12.04 mg/L (Tabelle III.10, III.11 e III.12).

I risultati ottenuti per le proteine e i carboidrati confermano ulteriormente quelli ottenuti per i lipidi: la geometria del fotobioreattore inclinato e il tipo di insufflazione mista con bolle macroscopiche e microscopiche forniscono le condizioni migliori per la crescita della diatomea centrica *C. cryptica* CCMP 331.

Il tipo di illuminazione esterna non influenza negativamente la fisiologia della diatomea, anche se la densità cellulare raggiunta in fase stazionaria risulta essere elevata e il fenomeno dell'auto-oscuramento avrebbe potuto influire sulla produttività in termini di biomassa e quindi sulla produzione di biocarburanti. Dall'analisi di tutti i dati ottenuti (biomassa, lipidi, proteine e carboidrati) con il fotobioreattore inclinato, si è arrivati alla conclusione che questo tipo di fotobioreattore è particolarmente indicato per la crescita delle diatomee centriche su larga scala per la produzione di bioenergie.

III.3.7. *Thalassiosira weissflogii* P09: curve di crescita e biomassa

Le crescite di *T. weissflogii* P09 nei tre differenti fotobioreattori sono state effettuate in triplicato (n=3).

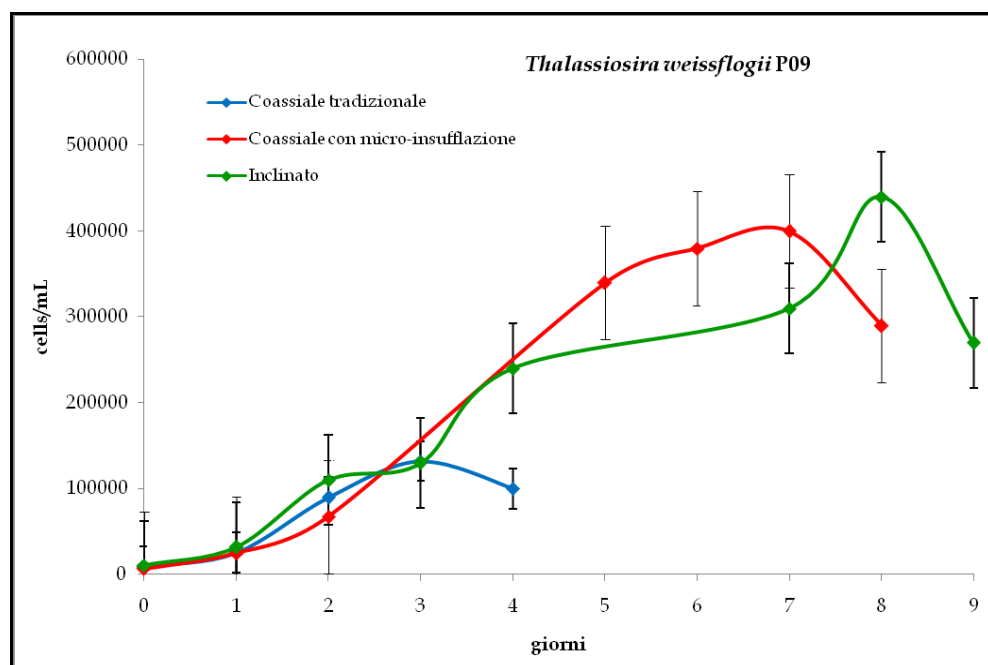


Figura III.5 – Curve di crescita di *Thalassiosira weissflogii* P09 nei tre fotobioreattori (n=3)

La Figura III.5 mostra l'andamento delle crescite di *T. weissflogii* P09 nei diversi fotobioreattori, determinata mediante il conteggio al microscopio ottico del numero di cellule per unità di volume (paragrafo III.2.5.). Le curve di crescita ottenute con il fotobioreattore inclinato e con il coassiale con micro-insufflazione sono molto simili in termini di cells/mL, mentre nel coassiale tradizionale si evidenzia un andamento peggiore della crescita, suggerendo che, anche per questa diatomea centrica, i sistemi più tradizionali di insufflazione sono

incompatibili con le condizioni fisiologiche di crescita e sono responsabili della rottura delle cellule stesse, come confermato dall'osservazione al microscopio ottico.

Le curve di crescita nei tre fotobioreattori di *T. weissflogii* P09 hanno una durata inferiore (3 - 8 giorni; Tabella III.13) rispetto all'altra diatomea centrica *C. cryptica* CCMP 331 (7 - 15 giorni; paragrafo III.3.5., Tabella III.9) alla diatomea pennata *C. fusiformis* CCMP 343 (9 - 17 giorni; paragrafo III.3.3., Tabella III.5) e alla microalga verde *N. salina* CCMP 369 (15 - 20 giorni; paragrafo III.3.1., Tabella III.1).

Le biomasse prodotte in fase stazionaria delle curva di crescita di *T. weissflogii* P09 riflettono le curve di crescita. Nel coassiale tradizionale, dove la curva di crescita è peggiore, la biomassa prodotta è di 0.11 g/L mentre nel coassiale con micro-insufflazione la resa raggiunge 0.34 g/L (Tabella III.13).

Tabella III.13 - Giorni di crescita, tempi di duplicazione, resa in biomassa (mg/L) e produttività in biomassa (mg/L/giorno) nel punto di fase stazionaria di *Thalassiosira weissflogii* P09 nei tre fotobioreattori (n=3)

<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	Giorni di crescita	Tempo di duplicazione (h)	Biomassa (mg/L)	Produttività biomassa (mg/L/giorno)
Coassiale tradizionale	3.5 ± 0.7	24.1 ± 7.6	114.59 ± 3.80	33.31 ± 5.64
Coassiale con micro-insufflazione	6.5 ± 0.7	23.9 ± 5.1	340.22 ± 11.42	52.56 ± 3.96
Inclinato	7.5 ± 0.7	33.8 ± 6.4	645.63 ± 243.39	84.93 ± 24.44

Le produttività nei due coassiali risultano essere paragonabili (coassiale tradizionale 33.31 ± 5.64 mg/L/giorno; coassiale con micro-insufflazione 52.56 ± 3.96 mg/L/giorno) anche se la resa in biomassa

nel coassiale tradizionale è di un terzo inferiore rispetto alla crescita effettuata nel coassiale con micro-insufflazione (Tabella III.13). La curva di crescita nel coassiale tradizionale presenta una durata media inferiore (3.5 giorni) rispetto a quella ottenuta nel coassiale con micro-insufflazione (6.5 giorni), andando quindi a influenzare la produttività in biomassa.

La curva di crescita di *T. weissflogii* P09 risulta essere migliore in termini di cells/mL nel fotobioreattore inclinato e il peso secco in biomassa prodotta risulta essere maggiore, aumentando fino a 0.65 g/L. Allo stesso modo, la produttività (mg/L/giorno) risulta essere maggiore quando *T. weissflogii* P09 è cresciuta nel fotobioreattore inclinato (84.93 ± 24.44 mg/L/giorno) (Tabella III.13), con un valore doppio rispetto a quello ottenuto nel coassiale con micro-insufflazione, anche se la durata della curva di crescita differisce di un solo giorno.

Il tipo differente di insufflazione dei due coassiali sembra non influenzare la produttività in biomassa di *T. weissflogii* P09, tuttavia dall'osservazione al microscopio, si evince che la qualità della biomassa è differente. Le bolle macroscopiche del fotobioreattore coassiale tradizionale determinano la rottura delle cellule e quindi la biomassa ottenuta risulta ricca di detriti cellulari. Nel coassiale con micro-insufflazione la crescita di questa diatomea risulta essere migliorata e il fotobioreattore inclinato, con tutte le sue caratteristiche tecniche, migliora ulteriormente le condizioni fisiologiche per la crescita della diatomea e la produttività in termini di biomassa,

esaltando la grande potenzialità di *T. weissflogii* P09 nella produzione massiva per scopi bioenergetici.

III.3.8. *Thalassiosira weissflogii* P09: lipidi, proteine e carboidrati

Nelle Tabelle III.14 e III.15 non è stato possibile distinguere l'inizio fase esponenziale, la media fase esponenziale e la tarda fase esponenziale in quanto le curve di crescita di *T. weissflogii* P09 risultano essere molto rapide (Tabella III.13) e si è preferito solo riportare i dati di lipidi, proteine e carboidrati della fase esponenziale, che corrisponde alla fase del ciclo vitale in cui si ha la massima velocità di crescita e la formazione della biomassa.

In tutti e tre i fotobioreattori la resa in biomassa (mg/L) della diatomea centrica *T. weissflogii* P09 risulta essere maggiore nel primo punto della fase senescente, anche se il numero di cellule per unità di volume (cells/mL) risulta essere inferiore rispetto alla fase stazionaria (Tabelle III.14, III.15 e III.16). Come per le altre microalghe cresciute in larga scala, anche per *T. weissflogii* P09 in questa fase della crescita la biomassa risulta essere maggiore perché costituita oltre che dalle cellule vitali (cells/mL) da detriti cellulari che però non contribuiscono alla conta cellulare.

Il contenuto massimo di lipidi (mg/L) prodotto da *T. weissflogii* P09 avviene in fase stazionaria in tutti e tre i fotobioreattori. Nel coassiale tradizionale si ottiene una resa di 16.50 ± 6.15 mg/L, valore molto basso dovuto alle bolle macroscopiche dell'insufflazione che creano condizioni di stress, non favoriscono la crescita della diatomea e

determinano una diminuzione della quantità di lipidi biosintetizzati. Nel coassiale con micro-insufflazione la resa è stata di 45.89 ± 13.37 mg/L, suggerendo un evidente miglioramento con le bolle microscopiche nella biosintesi lipidica. Nel fotobioreattore inclinato la quantità di lipidi prodotta risulta essere di 51.76 ± 3.94 mg/L, confermando che la geometria di questo fotobioreattore migliora la quantità di biomassa e di lipidi prodotta dalle diatomee centriche (Tabelle III.14, III.15 e III.16).

Tabella III.14 – Parametri monitorati durante la crescita di *Thalassiosira weissflogii* P09 nel fotobioreattore coassiale tradizionale (n=3)

<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09 – Coassiale tradizionale	Fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	66.00 ± 9.19	114.59 ± 3.80	124.72 ± 23.22
Lipidi (mg/L)	10.04 ± 5.04	16.50 ± 6.15	15.05 ± 0.56
Proteine (mg/L)	6.68 ± 0.84	30.48 ± 7.65	22.82 ± 3.09
Carboidrati (mg/L)	18.16 ± 0.34	22.45 ± 9.52	17.91 ± 3.24

Tabella III.15 – Parametri monitorati durante la crescita di *Thalassiosira weissflogii* P09 nel fotobioreattore coassiale con micro-insufflazione (n=3)

<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09 – Coassiale con micro-insufflazione	Fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	231.71 ± 32.46	340.22 ± 11.42	390.87 ± 24.85
Lipidi (mg/L)	25.77 ± 4.85	45.89 ± 13.37	37.64 ± 15.88
Proteine (mg/L)	70.20 ± 9.62	148.44 ± 26.70	142.06 ± 16.74
Carboidrati (mg/L)	8.32 ± 1.70	14.27 ± 4.05	10.06 ± 2.88

Tabella III.16 – Parametri monitorati durante la crescita di *Thalassiosira weissflogii* P09 nel fotobioreattore inclinato (n=3)

<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09 - Inclinato	Inizio fase esponenziale	Media fase esponenziale	Tarda fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
Biomassa (mg/L)	123.69 ± 42.35	181.53 ± 49.58	544.03 ± 232.78	645.63 ± 243.39	648.86 ± 241.38
Lipidi (mg/L)	9.60 ± 2.97	23.35 ± 2.97	34.60 ± 12.94	56.76 ± 3.13	33.92 ± 1.37
Proteine (mg/L)	63.83 ± 4.77	80.30 ± 15.13	114.00 ± 21.21	122.98 ± 30.26	117.23 ± 24.18
Carboidrati (mg/L)	4.89 ± 3.21	6.17 ± 1.36	9.41 ± 5.57	15.64 ± 2.61	13.75 ± 4.82

La resa proteica maggiore è stata ottenuta nel punto di fase stazionaria: 30.48 ± 7.65 mg /L nel coassiale tradizionale, 148.44 ± 26.70 mg/L nel coassiale con micro-insufflazione e 122.98 ± 30.26 mg/L nel fotobioreattore inclinato (Tabelle III.14, III.15 e III.16).

I carboidrati di *T. weissflogii* P09 raggiungono i valori massimi, anche in questo caso, in fase stazionaria. Nel coassiale tradizionale la resa è di 22.45 ± 9.52 mg/L, mentre nel coassiale con micro-insufflazione è di 14.27 ± 4.05 mg/L e nell'inclinato è di 15.64 ± 2.61 mg/L (Tabelle III.14, III.15 e III.16).

Dall'analisi di tutti i dati ottenuti (biomassa, lipidi, proteine e carboidrati) con il fotobioreattore inclinato, è stato possibile confermare i dati già ottenuti per *C. cryptica* CCMP 331. La geometria di questo fotobioreattore, il tipo di illuminazione esterna e l'insufflazione sinergica con bolle macroscopiche e microscopiche sono caratteristiche particolarmente adatte per la crescita delle diatomee centriche su larga scala per la produzione di bioenergie.

III.4. Conclusioni

Le produttività in lipidi, proteine e carboidrati (mg/L/giorno) in fase stazionaria delle 4 microalghe oggetto di questa sperimentazione nei tre fotobioreattori indoor per la produzione di biomassa da cui ricavare biodiesel sono riportate nelle Tabella III.17.

Tabella III.17 – Giorni di crescita e produttività in lipidi, proteine e carboidrati (mg/L/giorno) in fase stazionaria di *Nannochloropsis salina* CCMP 369, *Cylindrotheca fusiformis* CCMP 343, *Cyclotella cryptica* CCMP 331 e *Thalassiosira weissflogii* P09 (n=3)

		Produttività (mg/L/giorno)		
<i>Nannochloropsis salina</i> CCMP 369	Giorni di crescita	Lipidi	Proteine	Carboidrati
Coassiale tradizionale	21.7 ± 2.1	8.57 ± 0.70	1.34 ± 1.17	0.82 ± 0.75
Coassiale con micro-insufflazione	24.5 ± 6.4	7.45 ± 1.40	1.68 ± 0.81	3.85 ± 1.30
Inclinato	14.5 ± 0.7	6.02 ± 0.73	3.31 ± 1.04	0.52 ± 0.18
		Produttività (mg/L/giorno)		
<i>Cylindrotheca fusiformis</i> CCMP 343	Giorni di crescita	Lipidi	Proteine	Carboidrati
Coassiale tradizionale	10.0 ± 1.4	10.29 ± 0.53	13.42 ± 6.71	4.27 ± 0.87
Coassiale con micro-insufflazione	15.5 ± 2.1	9.24 ± 3.08	15.46 ± 3.38	10.14 ± 1.97
Inclinato	8.0 ± 1.4	3.36 ± 0.24	1.80 ± 0.18	1.46 ± 0.12
		Produttività (mg/L/giorno)		
<i>Cyclotella cryptica</i> CCMP 331	Giorni di crescita	Lipidi	Proteine	Carboidrati
Coassiale tradizionale	7.0 ± 1.4	0.84 ± 0.1	7.83 ± 1.01	5.09 ± 0.40
Coassiale con micro-insufflazione	10.7 ± 0.6	5.88 ± 1.89	9.12 ± 3.05	2.30 ± 0.78
Inclinato	13.5 ± 2.1	8.48 ± 0.1	8.49 ± 1.59	2.06 ± 0.57
		Produttività (mg/L/giorno)		
<i>Thalassiosira weissflogii</i> P09	Giorni di crescita	Lipidi	Proteine	Carboidrati
Coassiale tradizionale	3.5 ± 0.7	4.99 ± 2.76	8.66 ± 0.44	6.27 ± 1.45
Coassiale con micro-insufflazione	6.5 ± 0.7	6.99 ± 1.30	22.75 ± 1.63	2.17 ± 0.39
Inclinato	7.5 ± 0.7	7.58 ± 0.30	16.66 ± 5.61	2.08 ± 0.15

La frazione glucidica delle microalghe marine può essere utilizzata come substrato fermentabile. In particolare, la digestione anaerobica da parte di alcuni batteri può essere sfruttata per la produzione di altri biocarburanti, quali biometano o bioidrogeno.

Le condizioni ottimali per utilizzare *N. salina* CCMP 369 per la produzione di biogas sono state ottenute in fotobioreattore coassiale con micro-insufflazione dove la produttività è risultata essere di 3.85 ± 1.30 mg/L/giorno. Anche per *C. fusiformis* CCMP 343 il coassiale con micro-insufflazione ha fornito il risultato migliore (10.14 ± 1.97 mg/L/giorno). Per quanto riguarda le due diatomee centriche *C. cryptica* CCMP 331 e *T. weissflogii* P09, il coassiale tradizionale fornisce caratteristiche tecniche migliori e più adatte per la biosintesi dei carboidrati. La produttività massima di *C. cryptica* CCMP 331 è stata di 5.09 ± 0.40 mg/L/giorno mentre quella di *T. weissflogii* P09 è stata di 6.27 ± 1.45 mg/L/giorno (Tabella III.17).

In condizioni ottimali la produttività massima in lipidi raggiunta con *N. salina* CCMP 369 è stata di 8.57 ± 0.70 mg/L/giorno, con *C. fusiformis* CCMP 343 di 10.29 ± 0.53 mg/L/giorno, con *C. cryptica* CCMP 331 di 8.48 ± 0.1 mg/L/giorno e con *T. weissflogii* P09 di 7.58 ± 0.30 mg/L/giorno (Tabella III.17).

Per le caratteristiche della microalga verde *N. salina* CCMP 369 e della diatomea pennata *C. fusiformis* CCMP 343 risulta più adatto per la produzione di biodiesel il fotobioreattore coassiale tradizionale, mentre per le diatomee centriche *C. cryptica* CCMP 331 e *T. weissflogii* P09 mostra caratteristiche tecniche più adatte il fotobioreattore inclinato.

T. weissflogii P09 è la specie più promettente per la produzione di biodiesel, utilizzando un fotobioreattore inclinato, in quanto le produttività lipidiche sono paragonabili alle altre specie ma la durata media della crescita è di 7.5 ± 0.7 giorni (Tabella III.13).

La diatomea centrica *T. weissflogii* P09, con tutte le sue caratteristiche di robustezza, resistenza alle contaminazioni da parte di altri microrganismi, capacità di sedimentare spontaneamente e velocità di crescita risulta essere un'ottima candidata per una produzione massiva di biomassa.

La rapida crescita di questa diatomea centrica, rispetto alle altre microalghe oggetto di studio, fornisce un vantaggio molto importante in quanto consente una rapida diluizione della coltura in una crescita in continuo, aumentando l'efficienza fotosintetica dell'intero sistema biologico e rendendo *T. weissflogii* P09 la diatomea potenzialmente più adatta allo sviluppo di un sistema per la produzione di biodiesel in campo.

CAPITOLO IV

CRESCITE OUTDOOR IN FOTOBIOREATTORE

IV.1. Introduzione

IV.1.1. La luce

La luce rappresenta la fonte primaria di energia per la crescita di tutti gli organismi fotoautotrofi. Essa è costituita dall'insieme delle radiazioni visibili dello spettro elettromagnetico con lunghezza d'onda comprese tra 380 e 750 nm, che l'occhio umano percepisce nella gamma cromatica compresa fra il violetto ed il rosso. Essa è una piccola parte dell'ampio spettro di radiazioni provenienti dal sole e costituisce la luce utilizzabile per la fotosintesi (PAR, Photosynthetic Active Radiation).

La fotosintesi microalgale è influenzata dalla quantità e qualità della luce incidente e dalla densità cellulare delle colture (Richmond et al., 2000; You-Chul et al., 2005). Colture con densità cellulare elevata richiedono un'intensità luminosa maggiore per ottenere il massimo dell'attività fotosintetica, che, in ogni caso, risulta inferiore a quella che può essere raggiunta in una coltura con bassa densità cellulare, in quanto la luce è attenuata dall'elevata concentrazione dei microorganismi che si schermano fra di loro (You-Chul et al., 2005; Zou et al., 2000).

Le microalghe sono capaci di crescere a differenti intensità luminose ma possono andare incontro a fotoinibizione, ossia esposizione a

irradianza troppo elevata per periodi prolungati causa una diminuzione della velocità di crescita e in alcuni casi la morte cellulare. Sia la fotoinibizione che lo stress causato da una bassa irradianza provocano una diminuzione nella produzione della biomassa (Vonshak et al., 1994; Latasa, 1995).

Le alghe, tuttavia, si possono foto-acclimatare sia agli alti livelli di intensità luminosa che a quelli più bassi (Falkowski et al., 1991; Latasa, 1995; Zudaire et al., 2001; Voronova et al., 2009).

La luce naturale varia in intensità sia giornalmente, sia in base alle stagioni e soprattutto in base alla latitudine terrestre. Di conseguenza, la scelta della posizione geografica dove collocare i fotobioreattori risulta cruciale per ottenere una produttività in biomassa ottimale e per ottimizzare la crescita delle microalghe è necessario progettare impianti efficienti che permettano di controllare le condizioni di coltura e soprattutto, di sfruttare al meglio la fonte di luce incidente.

L'intensità luminosa influisce sulla qualità e la quantità di biodiesel che può essere prodotto dalle microalghe. Basse intensità luminose inducono la formazione di lipidi polari, in particolare quelli associati con i cloroplasti, mentre alte irradianze favoriscono la biosintesi dei lipidi neutri, in particolare trigliceridi (Napolitano, 1994; Brown et al., 1996). L'intensità luminosa determina anche il grado di insaturazione degli acidi grassi che costituiscono i trigliceridi: la bassa irradianza favorisce la formazione di acidi grassi polinsaturi (PUFA) (Sukenic et al., 1989).

IV.1.2. La temperatura

Da un punto di vista ecologico la temperatura rappresenta uno dei principali fattori climatici che esercita un'azione incisiva sulle caratteristiche degli ecosistemi e condiziona sensibilmente l'attività metabolica e lo sviluppo degli organismi viventi. La temperatura influenza la cinetica delle reazioni chimiche, poiché ad ogni incremento di 10 °C di temperatura si ha un aumento di circa il doppio della velocità di reazione.

I paesi Mediterranei (compresi fra il 45° e il 30° parallelo Nord) presentano caratteristiche migliori dal punto di vista ambientale e climatico per la crescita e la coltivazione delle microalghe. In particolare i paesi a sud del Mediterraneo (Marocco, Algeria, Tunisia, Egitto, Libia), dove le temperature medie durante l'anno non scendono mai al di sotto dei 15 °C, sembrano essere caratterizzati da un clima più idoneo per una produzione massiva (Singh et al., 2010).

La temperatura è il parametro che influenza maggiormente la composizione degli acidi grassi dei lipidi microalgali e quindi le caratteristiche del biodiesel prodotto. Si verifica un aumento delle insaturazioni con il diminuire della temperatura di crescita e, viceversa, un aumento degli acidi grassi saturi in presenza di temperature di crescita più elevate (Renaud et al., 2002).

In questo capitolo delle tesi dottorale vengono discussi i risultati della crescita di *T. weissflogii* P09 all'esterno per un intero anno solare nella città di Pozzuoli (40°49'40"N; 14°70'30"E) in provincia di Napoli. Scopo finale è andare a verificare come la variazione della

temperatura e dell'intensità solare influenzano la crescita di *T. weissflogii* P09, la produzione di biomassa, la quantità e la qualità del biodiesel ricavabile.

IV.2. Materiali e metodi

IV.2.1. Il fotobioreattore esterno

Per le colture su larga scala all'esterno è stato utilizzato un fotobioreattore inclinato con miscelazione ad *air lift* in polimetilmetacrilato (PMMA) ad alta trasparenza progettato dalla M2M Engineering s.r.l. (Figura IV.1).



Figura IV.1 - Il fotobioreattore esterno utilizzato in questo lavoro di tesi e collocato presso l'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Pozzuoli (Na)

Il fotobioreattore inclinato esterno (brevetto Neotica s.r.l e M2M Engineering s.r.l. WO/2011/007250) è un cilindro con diametro di 20 cm e lunghezza di 2 m. Il volume netto di coltura risulta essere di 60 litri e l'angolazione regolabile tra 25° e 60°, risultata essere la più adatta a sfruttare al meglio la fonte di luce incidente. Il sistema di agitazione delle colture mediante *air lift* prevede la combinazione sinergica di due tipi di insufflazione: quella a bolle macroscopiche e quella a bolle microscopiche di dimensioni paragonabili alle dimensioni delle cellule in coltura.

Questo fotobioreattore contiene una sonda in grado di rilevare costantemente la temperatura (°C) che la coltura microalgale raggiunge durante le ore del giorno e della notte.

IV.2.2. Condizioni di crescita nel fotobioreattore esterno

Il fotobioreattore inclinato è stato posizionato all'esterno dell'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Pozzuoli (Na). La sperimentazione ha avuto luogo da Settembre 2009 fino a Luglio 2010.

Tutte le colture sono state effettuate in fotobioreattore in acqua di mare proveniente dal Golfo di Napoli (salinità pari a circa 40 g/L, misurata utilizzando un rifrattometro ATC 106) e filtrata mediante filtri Millipore con pori del diametro di 1 µm.

L'acqua di mare utilizzata per le crescite in fotobioreattore non è stata autoclavata ed è stata arricchita con le soluzioni stock dei nutrienti del

medium di crescita f/2 (Guillard et al., 1962), come riportato nel capitolo II, paragrafo II.2.1:

- ☞ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O} = 30 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 883 μM).
- ☞ $\text{NaNO}_3 = 75 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 107 μM).
- ☞ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 5 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 36.3 μM).
- ☞ Soluzione oligoelementi (1 mL/L) contenente (g/L): Na_2EDTA 4.36 (concentrazione finale 11.7 μM) , $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 3.15 (concentrazione finale 11.7 μM), $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0.18, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.022, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.006.
- ☞ Vitamine (mg/L): biotina 0.5, cobalamina 0.5 e tiamina-HCl 100.0.

Per controllare il pH durante le fasi della crescita, è stato usato come tampone il Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 400 mM pH 7.8 (5 mL/L, concentrazione finale 2 mM).

Quotidianamente in ogni coltura in fotobioreattore sono stati aggiunti i nutrienti del medium f/2 a concentrazioni finali pari alla metà di quelle riportate in precedenza per evitare che l'eccessiva presenza di nutrienti nel medium di crescita potesse inibire o alterare la crescita microalgale e la fisiologia delle cellule (Terry, 1982; Rodolfi et al. 2009; Pahl et al., 2010).

IV.2.3. Preparazione degli inoculi per il fotobioreattore esterno

Le colture di *T. weissflogii* P09 utilizzate come inoculi per il fotobioreattore esterno sono state cresciute in carboy autoclavabili in polipropilene e policarbonato da 10 litri contenenti 5 litri di acqua di mare.

L'acqua di mare è stata filtrata 0.22 μm ed autoclavata, i nutrienti per il medium f/2 (capitolo II, paragrafo II.2.3.) sono stati sterilizzati mediante autoclave. Le colture sono state esposte a luce artificiale con un'intensità luminosa pari a 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e con un ciclo giornaliero di luce di 14 ore (e 10 ore di buio), alla temperatura di 20 ± 2 °C e con insufflazione d'aria costante. Queste colture quando hanno raggiunto la fase esponenziale di crescita sono state utilizzate come inoculo per la crescita su larga scala all'esterno.

IV.2.4. Parametri controllati in fotobioreattore esterno

La crescita cellulare è stata monitorata mediante conta cellulare quotidiana con camera di Bürker e osservazione della morfologia utilizzando un microscopio ottico a contrasto di fase (Nikon Eclipse E400) con un ingrandimento di 20 X. La concentrazione di cellule per mL (cells/mL) sarà determinata dal seguente calcolo:

$$\text{cells/mL} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

Ogni giorno è stato prelevato un litro di coltura e centrifugato a 2300 g (Allegra X12R - Beckman Coulter) per 10 minuti e il pellet così ottenuto è diviso in tre parti per effettuare le seguenti analisi:

- ☞ determinazione del contenuto proteico (capitolo II, paragrafo II.2.4.);
- ☞ determinazione del contenuto di carboidrati intracellulari (capitolo II, paragrafo II.2.5.);
- ☞ determinazione del contenuto lipidico (capitolo II, paragrafi II.2.6. e II.2.7.).

Il peso secco è stato stimato dopo aver lavato il pellet cellulare con formato di ammonio 0.5 M per rimuovere i sali dell'acqua di mare e del medium di crescita (Zhu et al., 1997). Il pellet così ottenuto è liofilizzato in modo tale da poter determinare il peso secco della biomassa.

Ogni giorno alle crescite di *T. weissflogii* P09 vengono aggiunti i nutrienti del medium f/2 e non ulteriore acqua di mare per sostituire il litro di coltura prelevato per monitorare la crescita: anche le colture all'esterno risultano essere in batch e non in continuo.

IV.2.5. Raccolta finale della biomassa

Alla fine della fase di crescita, l'intero volume di crescita di *T. weissflogii* P09 presente all'interno del fotobioreattore è stato centrifugato mediante una centrifuga a flusso tangenziale, realizzata appositamente dalla M2M Engineering s.r.l.

La velocità di centrifuga è stata di 6600 g e la coltura cellulare stata caricata all'interno della centrifuga utilizzando una pompa peristaltica a 110 g/minuto.

IV.3. Risultati e discussione

IV.3.1. Curve di crescita e biomassa di *Thalassiosira weissflogii* P09

Le temperature minime e massime raggiunte dalla coltura cellulare di *Thalassiosira weissflogii* P09 sono riportate in Tabella IV.1; i dati della radiazione solare giornaliera media sono stati ottenuti dal Atlante Italiano della Radiazione Solare dell'ENEA di Roma (<http://www.solaritaly.enea.it>).

Tabella IV.1 – Temperature massime e minime raggiunte all'interno della coltura microalgale da Settembre 2009 a Luglio 2010

Mese/Anno	Temperatura massima (°C)	Temperatura minima (°C)	Radiazione solare giornaliera (MJ m ⁻²)
Settembre 2009	36 ± 1	16 ± 1	15.04
Ottobre 2009	33 ± 1	14 ± 1	11.16
Novembre 2009	26 ± 1	10 ± 1	7.61
Dicembre 2009	25 ± 1	6 ± 1	6.15
Gennaio 2010	22 ± 1	4 ± 1	7.33
Febbraio 2010	21 ± 1	5 ± 1	9.84
Marzo 2010	22 ± 1	8 ± 1	13.58
Aprile 2010	27 ± 1	11 ± 1	16.97
Maggio 2010	30 ± 1	12 ± 1	20.11
Giugno 2010	38 ± 1	15 ± 1	21.78
Luglio 2010	45 ± 1	20 ± 1	21.87

La diatomea centrica è stata sottoposta durante le curve di crescita a un intervallo di temperature molto ampio variabile tra un minimo di 4 °C a un massimo di 45 °C. Questo risultato è molto importante in quanto la resistenza alle elevate temperature e alla fluttuazione annuale delle intensità luminose è una caratteristica fondamentale nella scelta della specie da utilizzare nelle crescite massive all'aperto.

Le curve di crescita riportate in Figura IV.1 sono quelle ottenute nell'intero arco dell'anno da Settembre 2009 a Luglio 2010.

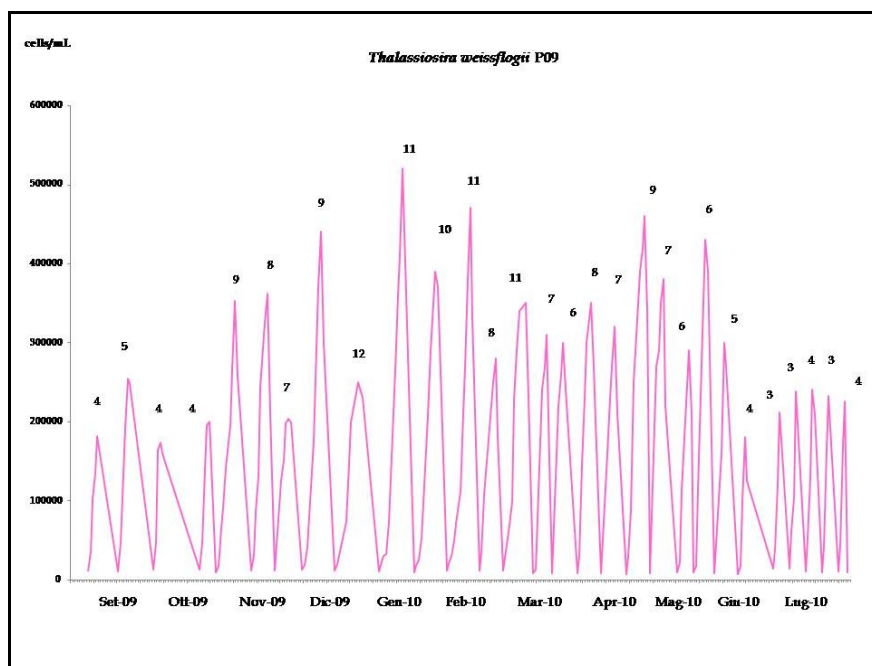


Figura IV.1 – Curve di crescita di *Thalassiosira weissflogii* P09 durante l'arco dell'anno (Settembre 2009 - Luglio 2010) nel fotobioreattore esterno; in alto sono indicati i giorni di durata delle curve di crescita

Nei mesi più caldi (da Giugno a Ottobre) le curve di crescita hanno una durata inferiore (3 - 5 giorni), raggiungendo un numero massimo di cellule per unità di volume di 270'000. Nei mesi più freddi (da Novembre a Maggio), le curve di crescita di *T. weissflogii* P09 possono raggiungere le 520'000 cells/mL e durare da 6 a 12 giorni (Figura IV.1). Queste differenze registrate nell'arco dell'anno sono da attribuire alle temperature più elevate e all'intensità luminosa media raggiunta nei mesi più caldi. Non si sono verificati fenomeni di fotoinibizione dovute alle alte irradianze raggiunte nei mesi estivi

(Tabella IV.1). In *T. weissflogii* è riportato che la dissipazione del calore e la fotoprotezione delle cellule avvengono tramite rapide modificazioni dei pigmenti accessori (carotenoidi e xantofille) presenti a livello del sistema antenna del PSII (Kolber et al., 1988; Lavaud et al., 2004; Voronova et al., 2009).

Tabella IV.2 – Biomasse (mg/L) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 da Settembre 2009 a Luglio 2010

Mese/Anno	Biomassa (mg/L)				
	1°	2°	3°	4°	5°
Settembre 2009	112.50	245.80	-	-	-
Ottobre 2009	220.23	167.95	-	-	-
Novembre 2009	341.02	496.70	-	-	
Dicembre 2009	325.80	387.61	-	-	-
Gennaio 2010	346.70	549.32	-	-	-
Febbraio 2010	824.55	729.32	-	-	-
Marzo 2010	408.98	873.52	565.34	-	-
Aprile 2010	641.36	568.89	619.89	-	-
Maggio 2010	625.91	517.39	369.43	-	-
Giugno 2010	447.95	294.66	101.59	89.34	-
Luglio 2010	67.50	170.00	152.75	181.02	180.00

Le rese in biomassa riportate in Tabella IV.2 sono quelle ottenute in fase senescente, in quanto nel capitolo III è stato dimostrato che la quantità di biomassa maggiore è prodotta alla fine della crescita. I risultati confermano le considerazioni fatte sulle curve di crescita mostrando che all'esterno aumenta la quantità di biomassa prodotta.

Il massimo è raggiunto all'inizio della primavera quando temperature e intensità luminosa consentono di ottenere fino a 873 mg/L di biomassa.

Le produttività (Tabella IV.3) risultano essere più basse nei mesi più caldi, raggiungendo il valore più basso alla fine del mese di Giugno (22.34 mg/L/giorno). La produttività maggiore ottenuta con *T. weissflogii* P09 risulta essere di 106.89 mg/L/giorno ed è stata raggiunta all'inizio del mese di Aprile. Questo risultato è compatibile con le caratteristiche fisiologiche di questa diatomea che all'inizio della primavera forma bloom a mare.

Tabella IV.3 – Produttività in biomassa (mg/L/giorno) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 da Settembre 2009 a Luglio 2010

Mese/Anno	Produttività in biomassa (mg/L/giorno)				
	1°	2°	3°	4°	5°
Settembre 2009	28.13	49.16	-	-	-
Ottobre 2009	55.06	41.99	-	-	-
Novembre 2009	37.89	62.08	-	-	-
Dicembre 2009	46.54	43.07	-	-	-
Gennaio 2010	28.89	49.94	-	-	-
Febbraio 2010	82.45	66.30	-	-	-
Marzo 2010	51.12	79.41	80.76	-	-
Aprile 2010	106.89	71.11	88.55	-	-
Maggio 2010	69.55	73.91	61.57	-	-
Giugno 2010	74.65	58.93	25.40	22.34	-
Luglio 2010	22.50	56.67	38.19	60.34	45.00

IV.3.2. Produttività in lipidi di *Thalassiosira weissflogii* P09

In Tabella IV.4 sono riportate le produttività lipidiche ottenute con *T. weissflogii* P09 durante l'arco dell'anno in cui è stata effettuata la sperimentazione all'esterno.

La produttività maggiore (14.92 mg/L/giorno) è stata ottenuta nel mese di Luglio, mese più caldo dell'anno alla latitudine e alla longitudine di Napoli, suggerendo chiaramente che le condizioni di stress causate da elevate temperature e alte intensità luminose, favoriscono il metabolismo lipidico. Questo risultato risulta essere molto importante nell'ottica dell'utilizzo di *T. weissflogii* P09 per la produzione di biodiesel su larga scala.

Tabella IV.4 – Produttività in lipidi (mg/L/giorno) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 da Settembre 2009 a Luglio 2010

Mese/Anno	Produttività in lipidi (mg/L/giorno)				
	1°	2°	3°	4°	5°
Settembre 2009	6.51	7.73	-	-	-
Ottobre 2009	10.57	5.71	-	-	-
Novembre 2009	7.12	5.81	-	-	-
Dicembre 2009	4.84	6.38	-	-	-
Gennaio 2010	4.36	6.61	-	-	-
Febbraio 2010	7.47	5.68	-	-	-
Marzo 2010	6.49	7.76	5.75	-	-
Aprile 2010	9.81	9.22	4.95	-	-
Maggio 2010	6.77	7.82	8.45	-	-
Giugno 2010	8.33	6.11	4.12	6.43	-
Luglio 2010	11.37	14.92	9.50	10.57	11.56

All'inizio di Ottobre e all'inizio di Aprile vengono registrati gli altri due valori più elevati in termini di produttività lipidica: 10.57 mg/L/giorno e 9.81 mg/L/giorno rispettivamente. Questi valori sono stati ottenuti in corrispondenza dei periodi massimi di crescita (bloom) che le diatomee raggiungono naturalmente a mare nell'arco dell'anno.

Comparando i risultati ottenuti con *T. weissflogii* P09 sullo stesso tipo di fotobioreattore inclinato all'interno, (capitolo III, paragrafo III.4, Tabella III.20) e all'esterno, si evince che la produttività lipidica all'esterno, dove le irradianze arrivano fino a 21.87 MJ m⁻², passa da 7.09 mg/L/giorno a 14.92 mg/L/giorno, indicando che le efficienze fotosintetiche sono maggiori.

IV.3.3. Caratteristiche del biodiesel di *Thalassiosira weissflogii* P09

Lo studio condotto nel fotobioreattore esterno ha anche permesso di analizzare le potenziali caratteristiche del biodisel prodotto da *T. weissflogii* P09 in condizioni industrializzabili.

Tabella IV. 5 – Percentuale di acidi grassi saturi prodotti da *Thalassiosira weissflogii* P09 da Settembre 2009 a Luglio 2010

Mese/Anno	% acidi grassi saturi				
	1°	2°	3°	4°	5°
Settembre 2009	48.74	45.51	-	-	-
Ottobre 2009	39.57	21.55	-	-	-
Novembre 2009	16.49	22.92	-	-	
Dicembre 2009	28.86	28.19	-	-	-
Gennaio 2010	31.67	28.78	-	-	-
Febbraio 2010	32.13	20.93	-	-	-
Marzo 2010	20.39	21.85	16.39	-	-
Aprile 2010	22.95	13.19	14.83	-	-
Maggio 2010	12.72	17.77	20.09	-	-
Giugno 2010	21.06	16.10	30.73	35.67	-
Luglio 2010	38.69	41.87	44.94	46.64	27.78

Come era possibile prevedere, la percentuale di acidi grassi saturi risulta essere più elevata (46.64%) quando le temperature sono maggiori, mentre il grado di insaturazione tende a aumentare al diminuire delle temperature nei periodi invernali (Tabella IV.5).

Il biodiesel prodotto con lipidi aventi una più alta percentuale di acidi grassi saturi possiede caratteristiche migliori poiché presenta una maggiore stabilità ossidativa e un più alto numero di cetani (Hu et al., 2008).

IV.3.4. Produttività in proteine e carboidrati di *Thalassiosira weissflogii* P09

In Tabella IV.6 e IV.7 sono riportate, rispettivamente, le produttività (mg/L/giorno) in termini di proteine e di carboidrati di *T. weissflogii* P09 durante l'arco dell'anno (Settembre 2009 - Luglio 2010) ottenute nel fotobioreattore esterno.

Sia per le proteine che per i carboidrati risultano essere più favorevoli le temperature e le intensità luminose più elevate dei periodi dell'anno più caldi in quanto le produttività maggiori vengono registrate nel mese di Luglio. La produttività proteica maggiore è stata di 41.73 mg/L/giorno (Tabella IV.6), mentre quella dei carboidrati risulta essere di 6.07 mg/L/giorno (Tabella IV.7).

Come già verificato per i lipidi, le intensità luminose maggiori dovute alla luce solare favoriscono la biosintesi anche di proteine e carboidrati in *T. weissflogii* P09.

Tabella IV. 6 – Produttività in proteine (mg/L/giorno) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 da Settembre 2009 a Luglio 2010

Mese/Anno	Produttività in proteine (mg/L/giorno)				
	1°	2°	3°	4°	5°
Settembre 2009	12.30	19.15	-	-	-
Ottobre 2009	10.67	12.77	-	-	-
Novembre 2009	8.47	9.96	-	-	
Dicembre 2009	17.78	12.25	-	-	-
Gennaio 2010	16.81	25.15	-	-	-
Febbraio 2010	15.07	13.84	-	-	-
Marzo 2010	23.06	21.82	31.43	-	-
Aprile 2010	36.83	26.41	21.15	-	-
Maggio 2010	12.64	20.41	17.75	-	-
Giugno 2010	20.59	22.50	26.24	24.81	-
Luglio 2010	23.79	21.73	17.50	11.38	14.24

Tabella IV. 7 – Produttività in carboidrati (mg/L/giorno) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 da Settembre 2009 a Luglio 2010

Mese/Anno	Produttività in carboidrati (mg/L/giorno)				
	1°	2°	3°	4°	5°
Settembre 2009	2.65	3.30	-	-	-
Ottobre 2009	2.96	2.33	-	-	-
Novembre 2009	0.63	2.79	-	-	
Dicembre 2009	3.41	4.60	-	-	-
Gennaio 2010	1.23	1.77	-	-	-
Febbraio 2010	4.16	1.38	-	-	-
Marzo 2010	2.71	1.87	1.95	-	-
Aprile 2010	1.49	3.58	5.09	-	-
Maggio 2010	4.11	2.71	4.67	-	-
Giugno 2010	2.63	1.92	0.96	2.84	-
Luglio 2010	0.35	2.50	1.33	5.07	3.78

IV.4. Conclusioni

In Tabella IV.8 sono riportate le produttività medie mensili (mg/L/giorno) di *T. weissflogii* P09 nel periodo compreso fra Settembre 2009 e Luglio 2010. Inoltre sono state registrate la temperatura massima raggiunta dalla coltura cellulare e la radiazione solare media giornaliera (paragrafo IV.3.1).

Tabella IV.8 - Produttività lipidica media mensile (mg/L/giorno), temperatura massima raggiunta e radiazione solare giornaliera per le colture di *Thalassiosira weissflogii* P09 da Settembre 2009 a Luglio 2010

Mese/Anno	Produttività lipidica media mensile (mg/L/giorno)	Temperatura massima (°C)	Radiazione solare media giornaliera (MJ m ⁻²)
Settembre 2009	7.12 ± 0.86	36 ± 1	15.04
Ottobre 2009	8.14 ± 3.44	33 ± 1	11.16
Novembre 2009	7.37 ± 0.93	26 ± 1	7.61
Dicembre 2009	5.61 ± 1.09	25 ± 1	6.15
Gennaio 2010	5.49 ± 1.59	22 ± 1	7.33
Febbraio 2010	6.58 ± 1.27	21 ± 1	9.84
Marzo 2010	6.67 ± 1.02	22 ± 1	13.58
Aprile 2010	7.99 ± 2.65	27 ± 1	16.97
Maggio 2010	7.68 ± 0.85	30 ± 1	20.11
Giugno 2010	6.25 ± 1.72	38 ± 1	21.78
Luglio 2010	11.58 ± 2.03	45 ± 1	21.87

Prendendo in considerazione i due parametri più importanti in una crescita microalgale all'esterno, la luce e la temperatura, la temperatura è il fattore che influenza positivamente la produttività di

T. weissflogii P09. Infatti, come si può vedere dal confronto tra Maggio e Luglio, vi è una differenza termica di 15 °C nelle temperature massime raggiunte dalla coltura cellulare (Tabella IV.8). La differenza dell'intensità luminosa è risultata essere minima in quanto nel mese di Maggio la radiazione solare media giornaliera è stata di 20.11 MJ m⁻² e nel mese di Luglio di 21.87 MJ m⁻². Nel mese di Luglio, quando la temperatura massima raggiunta nella coltura è stata di 45 °C, la produttività lipidica media mensile è risultata essere di 11.58 ± 2.03 mg/L/giorno.

T. weissflogii P09 non ha mostrato fenomeni di fotoinibizione ma nel mese di Luglio, quando la temperatura massima raggiunta nella coltura è stata di 45 °C, è stata ottenuta la produttività lipidica media mensile più alta di 11.58 ± 2.03 mg/L/giorno (Tabella IV.8).

La produzione di biodiesel media annuale ottenuta con la diatomea centrica *T. weissflogii* P09 è risultata essere di 7.27 mg/L/giorno, utilizzando un fotobiorattore inclinato di 60 litri.

CAPITOLO V

CRESCITA IN DUE FASI

V.1. Introduzione

V.1.1. I nutrienti

Oltre alla temperatura e alla luce, un fattore importante per la crescita delle microalghe è la disponibilità dei nutrienti che tende ad influenzare sia il contenuto lipidico che la composizione lipidica. (Guschina et al., 2006; Hu et al. 2008; Rodolfi et al., 2009). Le condizioni di stress causati dalla diminuzione di alcuni macronutrienti, quali azoto e silice per le diatomee, inducono la sintesi e l'accumulo di lipidi neutri da cui ricavare più energia rispetto a quella che si otterrebbe dall'ossidazione dei carboidrati (Roessler, 1988). Un aumento del contenuto lipidico fino al 70% in peso secco è stato verificato in varie specie microalgali cresciute in batch in limitazione di azoto, con un contemporaneo aumento degli acidi grassi saturi e monoinsaturi che vanno a costituire i trigliceridi (Roessler et al.,1990; Hu, 2004). Tuttavia, esiste una grande variabilità di risposta fra le microalghe alla riduzione di azoto nel medium di crescita. *Chlorella pyrenoidosa* aumenta la produzione di lipidi neutri, mentre *Dunaliella sp.* e *Tetraselmis suecica* mostrano diminuzione nel biosintesi dei lipidi (Hu, 2004). Il caso estremo è quello del genere *Chlorella* per la quale è stato riportato che alcuni strain, in limitazione

di azoto, accumulano amido mentre altri sintetizzano prevalentemente lipidi neutri (Hu, 2004).

Le diatomee, che sono caratterizzate da una fase esponenziale in cui il contenuto lipidico risulta essere già alto, non rispondono alla limitazione di azoto aumentando ulteriormente il contenuto lipidico (Shifrin et al., 1981; Benemann et al., 1996).

V.2. Materiali e metodi

V.2.1. Condizioni di crescita

T. weissflogii P09 è stata cresciuta in carboy autoclavabili in polipropilene e policarbonato da 10 litri con 5 litri di acqua di mare proveniente dal Golfo di Napoli con una salinità pari a circa 40 g/L (rifrattometro ATC 106).

Per ottenere colture monospecifiche è stato necessario filtrare l'acqua di mare su filtri Millipore con pori del diametro di 0.22 μm ed effettuare la sterilizzazione in autoclave alla temperatura di 121 °C ed alla pressione di 1 atm per 20 minuti. Successivamente si è proceduto all'aggiunta dei nutrienti, anch'essi autoclavati, ad eccezione delle vitamine che, per la loro struttura chimica, risultano essere altamente sensibili alla temperatura (Helm, 1990) e che per questa ragione sono state solamente filtrate (filtri Millipore, 0.22 μm).

L'acqua di mare è stata arricchita con le soluzioni stock dei nutrienti del medium di crescita f/2 (Guillard et al., 1962) come riportato nel capitolo II, paragrafo II.2.1:

- ☞ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O} = 30 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 883 μM).
- ☞ $\text{NaNO}_3 = 75 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 107 μM).
- ☞ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 5 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 36.3 μM).
- ☞ Soluzione oligoelementi (1 mL/L) contenente (g/L): Na_2EDTA 4.36 (concentrazione finale 11.7 μM) , $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 3.15 (concentrazione finale 11.7 μM), $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 0.18, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0.022, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0.006.
- ☞ Vitamine (mg/L): biotina 0.5, cobalamina 0.5 e tiamina-HCl 100.0.

Per controllare il pH durante le fasi della crescita, è stato usato come tampone il Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 400 mM pH 7.8 (5 mL/L, concentrazione finale 2 mM).

Le colture sono state esposte a luce artificiale con un'intensità luminosa pari a 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e con un ciclo giornaliero di luce di 14 ore (e 10 ore di buio), alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e con insufflazione d'aria costante. Queste colture, quando hanno raggiunto l'inizio della fase esponenziale di crescita, sono state utilizzate per gli esperimenti di seconda fase. Le cellule di *T. weissflogii* P09 sono state messe a sedimentare e il pellet umido così ottenuto è stato rimesso in crescita, aggiungendo nuova acqua di mare e di nuovo tutti i nutrienti alle concentrazioni descritte nel paragrafo V.2.1. Nel caso degli

esperimenti in privazione di azoto, l' NaNO_3 presente nel medium f/2 è stato completamente eliminato. Quando sono state allestite le prove in seconda fase sono stati aggiunti i nutrienti del f/2 anche nella coltura di riferimento sempre alle concentrazioni descritte nel paragrafo V.2.1.

V.2.2. Parametri controllati durante le crescite

Le prove di crescita in due fasi sono state effettuate in batch fino a che le cellule non hanno raggiunto la loro fase senescente. La crescita cellulare è stata monitorata quotidianamente mediante conta cellulare con camera di Bürker e osservazione della morfologia utilizzando un microscopio ottico a contrasto di fase (Nikon Eclipse E400) con un ingrandimento di 20 X. La concentrazione di cellule per mL (cells/mL) sarà determinata dal seguente calcolo:

$$\text{cells/mL} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

Quando le cellule hanno raggiunto la fase senescente, la coltura microalgale è stata fermata e centrifugata a 2300 g (Allegra X12R - Beckman Coulter) per 10 minuti a 8 - 10 °C e il pellet così ottenuto è stato utilizzato per determinare il contenuto lipidico (capitolo II, paragrafo II.2.6.).

Il peso secco è stato stimato dopo aver lavato il pellet cellulare con formato di ammonio 0.5 M per rimuovere i sali dell'acqua di mare e del medium di crescita (Zhu et al., 1997). Il pellet microalgale così ottenuto è liofilizzato in modo tale da poter determinare il peso secco della biomassa.

V.3. Risultati e discussione

V.3.1. Curve di crescita e biomasse ottenute in seconda fase con *Thalassiosira weissflogii* P09

Le crescite di *T. weissflogii* P09 per l'esperimento in seconda fase sono state effettuate in duplicato (n=2).

In Figura V.1 sono riportate le curve di crescita di *T. weissflogii* P09. La curva in azzurro è quella normalmente ottenuta in carboy da 10 litri con 5 litri di coltura cresciuta a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (riferimento); in rosa è la curva in seconda fase con f/2 completo a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; in giallo è riportata la curva in seconda fase con f/2 senza azoto a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; in verde è rappresentata la curva di crescita in seconda fase con f/2 completo a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e in rosso invece quella con f/2 senza azoto a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Indipendentemente dalle condizioni utilizzate, si verifica un allungamento della durata delle curve di crescita di *T. weissflogii* P09, passando da 4 giorni per raggiungere la fase stazionaria della curva di riferimento (azzurra) a 6 - 7 giorni delle prove in seconda fase. Il numero massimo di cellule nell'unità di volume nella curva di riferimento è di 370'000, mentre i valori registrati per le altre curve risultano essere leggermente inferiori, ad eccezione per la curva di crescita in seconda fase con f/2 senza azoto a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura V.1), dove si raggiungono i 420'000 cells/mL.

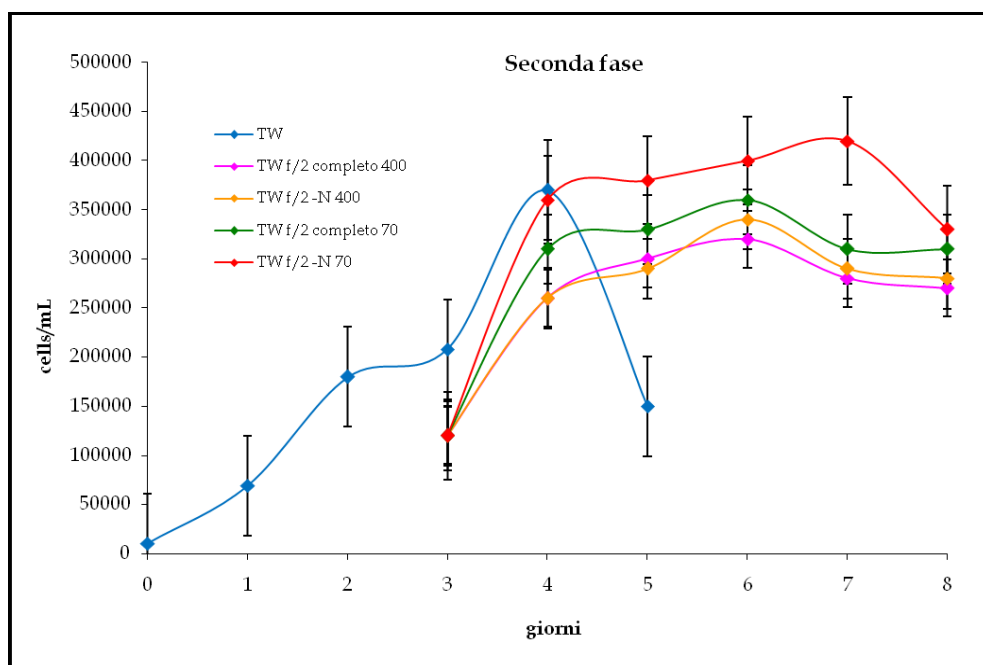


Figura V.1 – Curve di crescita di *Thalassiosira weissflogii* P09 in seconda fase (n=2)

Tabella V.1 – Rese in biomassa (mg/L) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 negli esperimenti in seconda fase (n=2)

Biomassa (mg/L)	Fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
TW	112.50 ± 34.08	236.85 ± 43.35	221.70 ± 11.46
TW f/2 completo 400	268.85 ± 139.51	441.00 ± 12.16	465.80 ± 21.50
TW f/2 -N 400	267.95 ± 124.66	388.00 ± 78.06	434.30 ± 0.14
TW f/2 completo 70	234.05 ± 147.51	387.80 ± 49.21	413.20 ± 24.32
TW f/2 -N 70	230.25 ± 105.1	376.70 ± 26.16	389.90 ± 10.89

Analizzando i dati ottenuti (Tabella V.1) per quanto riguarda le rese in biomassa (mg/L) appare evidenti che i valori massimi sono raggiunti in fase senescente in tutti e cinque gli esperimenti effettuati. Come già detto in precedenza, in questa fase della crescita, la biomassa risulta essere maggiore perché costituita oltre che dalle cellule vitali

(cells/mL) da detriti cellulari che però non contribuiscono al conteggio totale.

Nelle diverse condizioni sperimentali della seconda fase, la biomassa (mg/L) ottenuta in fase senescente risulta essere molto maggiore nei confronti dell'esperimento di riferimento (221.70 ± 11.46 mg/L). Infatti, con f/2 completo a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la biomassa raggiunge 465.80 ± 21.50 mg /L, mentre con la stessa intensità ma senza azoto la resa scende a 434.30 ± 0.14 mg/L. Nell'esperimento con f/2 completo a $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ si ottiene una biomassa di 413.20 ± 24.32 mg/L, mentre senza azoto e con la stessa intensità luminosa, la biomassa risulta essere di 389.90 ± 10.89 mg/L.

Tabella V.2 – Produttività in biomassa (mg/L/giorno) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 in fase stazionaria negli esperimenti in seconda fase (n=2)

	Produttività biomassa (mg/L/giorno)
TW	59.21 ± 10.84
TW f/2 completo 400	68.15 ± 5.54
TW f/2 -N 400	59.39 ± 5.55
TW f/2 completo 70	59.60 ± 1.09
TW f/2 -N 70	53.81 ± 3.74

Prendendo in considerazione i risultati ottenuti per quanto riguarda le produttività (mg/L/giorno) appare evidente che il cambio dell'acqua di mare e l'aggiunta di nuovi nutrienti negli esperimenti in seconda fase determina un aumento della resa (Tabella V.2). Inoltre la deprivazione di azoto, indipendentemente dall'intensità luminosa utilizzata per la crescita, tende a influenzare negativamente le rese, suggerendo come questo elemento risulta fondamentale per la

fisiologia delle diatomee. La minore intensità luminosa utilizzata ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) non risulta essere ottimale per la fotosintesi, comportando una riduzione della biomassa e confermando ulteriormente i dati ottenuti con la sperimentazione annuale all'esterno di *T. weissflogii* P09, trattata nel capitolo IV.

V.3.2. Resa e produttività lipidica ottenuta in seconda fase con *Thalassiosira weissflogii* P09

Dall'analisi delle rese in lipidi (mg/L) i valori massimi sono stati raggiunti in fase stazionaria. Dal confronto dei dati in questo punto della fase di crescita risulta evidente che la quantità di lipidi ($25.95 \pm 5.44 \text{ mg/L}$) nella curva di riferimento (curva azzurra) è inferiore rispetto a quella raggiunta negli esperimenti di seconda fase che variano da $52.10 \pm 32.67 \text{ mg/L}$ a $66.90 \pm 20.79 \text{ mg/L}$ (Tabella V.3).

Tabella V.3 – Rese in lipidi (mg/L) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 negli esperimenti in seconda fase (n=2)

Biomassa (mg/L)	Fase esponenziale	Fase stazionaria	Fase senescente
TW	13.05 ± 1.63	25.95 ± 5.44	21.20 ± 5.66
TW f/2 completo 400	24.95 ± 2.47	66.90 ± 20.79	61.40 ± 0.85
TW f/2 -N 400	27.45 ± 5.44	63.60 ± 18.67	51.50 ± 2.97
TW f/2 completo 70	24.75 ± 3.89	55.50 ± 5.80	45.30 ± 5.80
TW f/2 -N 70	27.55 ± 6.58	52.10 ± 32.67	37.50 ± 16.26

Non risulta dai dati ottenuti in questo lavoro di tesi dottorale un aumento della biosintesi lipidica in deprivazione di azoto. Infatti, l'aumento della quantità di lipidi è probabilmente dovuto all'aumento

di biomassa che si verifica in seguito al cambio del mezzo di crescita e dall'aggiunta di nuovi nutrienti. Anche l'intensità dell'illuminazione non contribuisce all'aumento dei lipidi biosintetizzati perché le crescite a 400 e a 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostrano una resa invariata (Tabella V.3).

Tabella V.4 – Produttività lipidica (mg/L/giorno) ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 in fase stazionaria negli esperimenti in seconda fase (n=2)

	Produttività lipidi (mg/L/giorno)
TW	6.49 ± 1.36
TW f/2 completo 400	10.53 ± 4.34
TW f/2 -N 400	10.00 ± 3.96
TW f/2 completo 70	8.75 ± 3.85
TW f/2 -N 70	7.44 ± 4.67

Questo risultato trova ulteriore conferma analizzando le produttività lipidiche dei vari esperimenti di seconda fase da *T. weissflogii* P09 (Tabella V.4), che aumentano passando da 6.49 ± 1.36 mg/L/giorno (esperimento di riferimento), a 10.53 ± 4.34 mg/L/giorno utilizzando un mezzo completo a 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

V.4. Conclusioni

I risultati sulle crescite in seconda fase hanno dimostrato che la privazione di azoto non è responsabile dell'aumento della quantità di lipidi biosintetizzati, in quanto questo aumento è registrato sia in presenza che in assenza di NaNO_3 . L'aumento della biomassa e dei lipidi sono conseguenza del cambio dell'acqua di mare dopo la

sedimentazione delle cellule all'inizio della fase esponenziale, suggerendo un effetto auto-inibitorio di una o più classi di molecole prodotte dalle diatomee stesse che determinano la fine della crescita. Questa inibizione non può essere attribuita alla mancanza dei nutrienti, poiché nella coltura di riferimento (curva azzurra della Figura V.1, paragrafo V.3.1) dove risulta evidente l'effetto di diminuzione del numero di cellule, sono stati aggiunti tutti i nutrienti del medium f/2 nello stesso momento in cui sono state allestiti gli esperimenti di seconda fase.

CAPITOLO VI

CRESCITA IN PRESENZA DI GAS DI SCARICO

VI.1. Introduzione

VI.1.1. I gas di scarico

L'aumento della concentrazione di CO₂ è considerato una delle cause principali dell'inquinamento globale. La combustione dei carburanti di origine fossile è responsabile del 73% della produzione di CO₂. Nel corso degli anni passati (a partire dagli anni cinquanta) numerose ricerche, per lo più condotte in laboratorio (Olaizola, 2003) e, in misura minore, in colture all'aperto (Matsumoto et al., 1995; Pedroni et al., 2004) hanno dimostrato che è possibile coltivare efficacemente le microalghe utilizzando direttamente i gas di combustione. La possibilità di eliminare insieme alla CO₂ contaminanti aggiuntivi ai gas di combustione, in particolare NO_x e SO_x, costituisce un'opportunità per integrare lo smaltimento di questi gas con la coltura di microalghe. Nel caso degli NO_x, sia NO sia NO₂ possono essere assorbiti e utilizzati dalle microalghe per la crescita (Negoro et al., 1993; Nagase et al., 2001).

VI.2. Materiali e metodi

V.2.1. Condizioni di crescita

T. weissflogii P09 è stata cresciuta in carboy autoclavabili in polipropilene e policarbonato da 2 litri contenenti 1.5 litri di acqua di mare per le prove in presenza dei gas di scarico. L'acqua di mare proviene dal Golfo di Napoli ed ha una salinità pari circa a 40 g/L (misurata utilizzando un rifrattometro ATC 106).

Per ottenere colture monospecifiche è stato necessario filtrare l'acqua di mare mediante filtri Millipore con pori del diametro di 0.22 μm ed effettuare la sterilizzazione in autoclave alla temperatura di 121 °C ed alla pressione di 1 atm per 20 minuti. Successivamente si è proceduto all'aggiunta dei nutrienti, anch'essi autoclavati, ad eccezione delle vitamine che, per la loro struttura chimica, risultano essere altamente sensibili alla temperatura (Helm, 1990) e che per questa ragione sono state solamente filtrate (filtri Millipore, 0.22 μm).

L'acqua di mare è stata arricchita con le soluzioni stock dei nutrienti del medium di crescita f/2 (Guillard et al., 1962) come riportato nel capitolo II, paragrafo II.2.1:

- ☞ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O} = 30 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 883 μM).
- ☞ $\text{NaNO}_3 = 75 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 107 μM).
- ☞ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O} = 5 \text{ g/L}$ (1 mL/L, concentrazione finale 36.3 μM).

- ☞ Soluzione oligoelementi (1 mL/L) contenente (g/L): Na₂EDTA 4.36 (concentrazione finale 11.7 μM) , FeCl₃ × 6H₂O 3.15 (concentrazione finale 11.7 μM), MnCl₂ × 4H₂O 0.18, CuSO₄ × 5H₂O 0.01, ZnSO₄ × 7H₂O 0.022, CoCl₂ × 6H₂O 0.01, NaMoO₄ × 2H₂O 0.006.
- ☞ Vitamine (mg/L): biotina 0.5, cobalamina 0.5 e tiamina-HCl 100.0.

Per controllare il pH durante le fasi della crescita, è stato usato come tampone il Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) 400 mM pH 7.8 (5 mL/L, concentrazione finale 2 mM).

Le colture sono esposte a luce artificiale con un'intensità di 100 μmol m⁻² s⁻¹, sottoposte ad un fotoperiodo di 14 ore di luce e 10 ore di buio, alla temperatura di 20 ± 2 °C e con insufflazione costante di aria.

Per gli esperimenti con i gas di scarico, è stata utilizzata una miscela di NO_x con la seguente composizione gassosa: monossido di azoto (NO) 1.87%, protossido di azoto (N₂O) 9.49%, diossido d'azoto (NO₂) 9.10%, azoto (N₂) 79.54%. La quantità testata di NO_x con la diatomea *T. weissflogii* P09 è stata di 500 ppm; il tempo di insufflazione è stato di 3 ore durante le ore di luce.

VI.2.2. Parametri controllati durante le crescite

Le prove con i gas di scarico sono state effettuate in batch fino a che le cellule non hanno raggiunto la loro fase senescente. La crescita cellulare è stata monitorata quotidianamente mediante conta cellulare

con camera di Bürker e osservazione della morfologia utilizzando un microscopio ottico a contrasto di fase (Nikon Eclipse E400) con un ingrandimento di 20 X. La concentrazione di cellule per mL (cells/mL) sarà determinata dal seguente calcolo:

$$\text{cells/mL} = \text{conteggio medio per quadrato} \times \text{fattore di diluizione} \times 10^4$$

Quando le cellule hanno raggiunto la fase senescente, la coltura microalgale è stata fermata e centrifugata a 2300 g (Allegra X12R - Beckman Coulter) per 10 minuti a 8 - 10 °C e il pellet così ottenuto è diviso in tre parti per effettuare le seguenti analisi:

- ☞ determinazione del contenuto proteico (capitolo II, paragrafo II.2.4.);
- ☞ determinazione del contenuto di carboidrati intracellulari (capitolo II, paragrafo II.2.5.);
- ☞ determinazione del contenuto lipidico (capitolo II, paragrafo II.2.6.).

Il peso secco è stato stimato dopo aver lavato il pellet cellulare con formato di ammonio 0.5 M per rimuovere i sali dell'acqua di mare e del medium di crescita (Zhu et al., 1997). Il pellet microalgale così ottenuto è liofilizzato in modo tale da poter determinare il peso secco della biomassa.

VI.3. Risultati e discussione

VI.3.1. Curve di crescita e biomasse ottenute con i gas di scarico con *Thalassiosira weissflogii* P09

In Figura VI.1 vengono riportate le curve di crescita di *T. weissflogii* P09 ottenute in presenza dei gas di scarico: la curva in viola è la crescita di riferimento in f/2 completo con insufflazione di aria, quella in rosa rappresenta la crescita in f/2 senza azoto con aria, in nero quella ottenuta sempre in f/2 completo ma con l'insufflazione degli NOx e in arancio la curva di crescita in f/2 senza azoto ma in presenza di NOx.

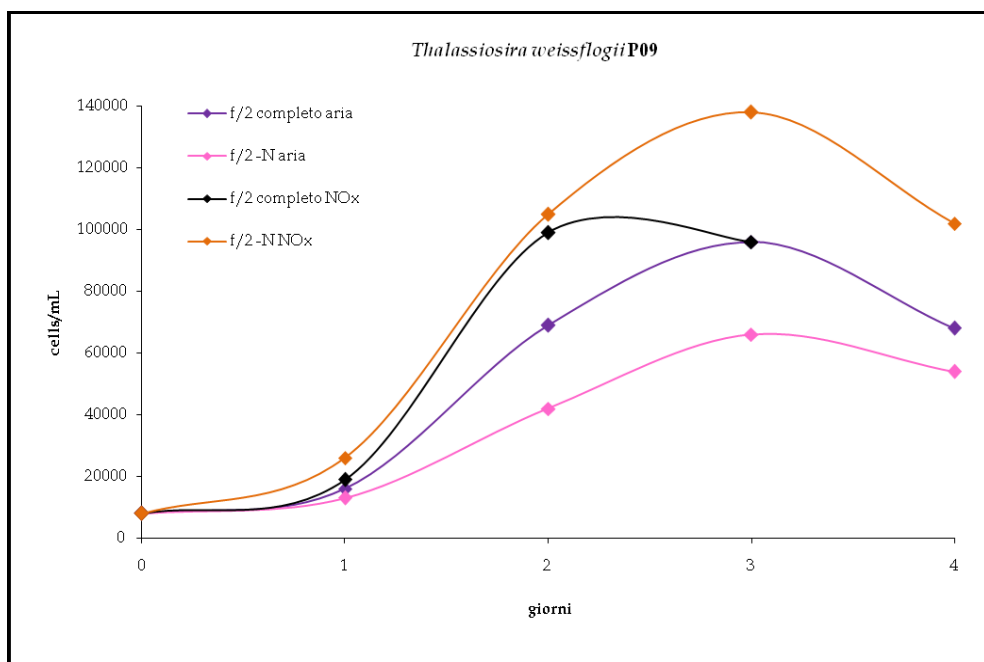


Figura VI.1 - Curve di crescita di *Thalassiosira weissflogii* P09 negli esperimenti con i gas di scarico

Confrontando le curve di crescita ottenute risulta evidente che il numero di cellule massimo per unità di volume viene raggiunto quando vengono insufflati gli NO_x nella coltura di *T. weissflogii* P09, sia in presenza che in assenza di azoto nel medium di crescita.

Tuttavia, la coltura di *T. weissflogii* P09 cresciuta in f/2 completo con l'aggiunta di NO_x al terzo giorno di crescita (curva in nero) va rapidamente in fase senescente, probabilmente a causa della diminuzione repentina del pH a 2. Lo stesso fenomeno non si è verificato con la coltura in f/2 senza azoto con NO_x. Questa differenza di comportamento è dovuto al fatto che, in assenza di NaNO₃ nel medium di crescita, gli NO_x vengono assorbiti dalle cellule e utilizzati come fonte di azoto, necessario per la fisiologia delle diatomee. Quando nel medium f/2 è presente il nitrato di sodio, le cellule non assorbono gli NO_x che quindi vengono accumulati e il loro eccesso nel medium di crescita determina l'abbassamento del pH verso valori molto acidi.

Tabella VI.1 - Rese (mg/L) e produttività (mg/L/giorno) in biomassa ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 negli esperimenti con i gas di scarico

	Biomassa (mg/L)	Produttività biomassa (mg/L/giorno)
TW f/2 completo aria	183.52	61.17
TW f/2 -N aria	175.80	58.60
TW f/2 completo NO _x	105.00	52.50
TW f/2 -N NO _x	118.42	39.47

La produttività in biomassa ottenuta in presenza di aria nella crescita con f/2 completo è risultata essere di 61.17 mg/L/giorno, mentre in

assenza di azoto raggiunge i 58.60 mg/L/giorno. In presenza di NO_x, *T. weissflogii* P09 presenta una produttività in biomassa di 52.50 mg/L/giorno in f/2 completo, mentre in deprivazione di azoto il valore ottenuto è stato di 39.47 mg/L/giorno (Tabella VI.1). Questa diminuzione della biomassa, associata ad un aumento del numero di cellule per unità di volume (Figura VI.1), suggerisce che le cellule possano essere più piccole delle loro dimensioni normali.

VI.3.2. Resa e produttività in lipidi, proteine e carboidrati ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 in presenza di gas di scarico

Le analisi per quanto riguarda i lipidi, le proteine e i carboidrati sono state effettuate in fase stazionaria in quanto, in accordo con quanto riportato nel capitolo III, è stato dimostrato che il contenuto massimo di queste macromolecole è raggiunto proprio in questa fase della crescita.

Tabella VI.2 – Rese (mg/L) e produttività (mg/L/giorno) in lipidi ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 negli esperimenti con i gas di scarico

	Lipidi (mg/L)	Produttività lipidica (mg/L/giorno)
TW f/2 completo aria	18.07	6.02
TW f/2 -N aria	13.41	4.47
TW f/2 completo NO_x	18.86	9.43
TW f/2 -N NO_x	24.20	8.07

La resa lipidica ottenuta in f/2 completo con aria è di 18.07 mg/L, valore paragonabile a quella conseguita in f/2 completo in presenza

di NO_x (18.86 mg/L), confermando ulteriormente il fatto che i gas di scarico non vengono assorbiti da *T. weissflogii* P09 in presenza di azoto nel medium di crescita (Tabella VI.2). In deprivazione di azoto la resa è stata di 13.41 mg/L, suggerendo la particolare importanza di questo macronutriente nella fisiologia della diatomea. Nella crescita in f/2 senza azoto e in presenza dei gas di scarico la resa lipidica cresce a 24.20 mg/L, suggerendo che le cellule in queste condizioni di crescita risultano essere più numerose, più piccole e più ricche in lipidi.

Tabella VI.3 – Rese (mg/L) e produttività (mg/L/giorno) in proteine e carboidrati ottenute con *Thalassiosira weissflogii* P09 negli esperimenti con i gas di scarico

	Proteine (mg/L)	Produttività proteine (mg/L/giorno)	Carboidrati (mg/L)	Produttività carboidrati (mg/L/giorno)
TW f/2 completo aria	9.69	3.23	3.34	1.11
TW f/2 -N aria	6.21	2.07	3.76	1.25
TW f/2 completo NO_x	10.64	5.32	4.00	2.00
TW f/2 -N NO_x	21.90	7.30	3.55	1.18

Dal confronto dei dati ottenuti per le rese in proteine (Tabella VI.3) consegue che la presenza di NO_x aumenta la biosintesi delle proteine solo quando i gas di scarico sono assorbiti dalle cellule di *T. weissflogii* P09, cosa che accade solamente in assenza di azoto nel medium di crescita. In queste condizioni, la resa proteica raggiunta è stata di 7.30 mg/L.

La resa in carboidrati di *T. weissflogii* P09 è stata di 3.34 mg/L in f/2 completo e di 3.76 mg/L in f/2 senza azoto in presenza di aria. Per le prove con gli NO_x in f/2 completo la resa è stata di 4.00 mg/L e in

deprivazione di azoto di 3.55 mg/L (Tabella VI.3). Per quanto riguarda la frazione glucidica non ci sono variazioni significative nelle differenti condizioni sperimentali, indicando che la via metabolica dei carboidrati non risulta influenzata dall'assorbimento degli NOx.

VI.4. Conclusioni

T. weissflogii P09, come tutte le diatomee, è in grado di assorbire enormi quantità di CO₂, riflettendo la capacità intrinseca del phylum che è responsabile del 40% della produttività primaria marina. La possibilità di eliminare insieme alla CO₂ componenti aggiuntivi ai gas di combustione, in particolare NOx, costituisce un'opportunità importantissima per la diminuzione dei gas ad effetto serra.

La diatomea centrica *T. weissflogii* P09 è in grado di assorbire livelli elevati di NOx (500 ppm per 3 ore in fase luminosa) che favoriscono il metabolismo lipidico, portando a una maggiore quantità di lipidi biosintetizzati utilizzabili per la produzione del biodiesel.

CAPITOLO VII

CONCLUSIONI

In questa tesi dottorale per la prima volta si è scelto di utilizzare una diatomea centrica per la produzione di biocarburanti su larga scala in condizioni outdoor.

T. weissflogii P09 è risultata essere una diatomea oleaginosa in grado di fornire una produzione di biodiesel media annuale di 7.27 mg/L/giorno.

T. weissflogii P09 cresciuta in Campania (Pozzuoli, Napoli) in fotobioreattore inclinato da 60 litri presenta una produzione annuale di circa 2 tonnellate di olio per ettaro in colture in batch dal quale può essere ottenuta la stessa quantità di biodiesel. Questo valore può raggiungere anche le 5 tonnellate per ettaro in crescite effettuate in continuo.

La produttività della diatomea oggetto di studio, considerando una coltura in batch di 60 litri) è risultata essere di 2.2 volte superiore ad una coltura di girasoli (945 Kg/ha/anno), di 2.3 volte maggiore a quella ottenuta dai semi di colza (862 Kg/ha/anno), di 3.5 volte superiore a quella dei semi di soia (562 Kg/ha/anno) e di 13.3 volte quella del mais (152 Kg/ha/anno). Il risultato migliore in termini di quantità di olio prodotto per ettaro di superficie utilizzata attualmente risulta essere la palma da olio da cui è possibile ricavare 4747 Kg/ha/anno (Chisti, 2007).

La quantità di biodiesel prodotta da *Thalassiosira weissflogii* P09 risulta essere il doppio aumentando il volume del fotobioreattore utilizzato a parità di superficie occupata, caratteristica importante e molto vantaggiosa rispetto alle piante oleaginose.

Ulteriori miglioramenti sono stati verificati con la crescita in due fasi e l'utilizzo di elevate concentrazioni di gas di scarico (CO₂ e NO_x). Le condizioni di stress inducono la biosintesi e l'accumulo di lipidi neutri nella diatomea *T. weissflogii* P09, migliorando le caratteristiche della biomassa da utilizzare per la produzione di biodiesel.

BIBLIOGRAFIA

Acien-Fernandez F.G., Hall D.O., Canizares Guerrero E., Krishna Rao K., Molina Grima E. (2003) – Outdoor production of *Phaeodactylum tricornutum* biomass in a helical reactor. *Journal of Biotechnology* 103: 137-152.

Alekseeva S.A., Shevchenko N.M., Kusaykin M.I., Ponomorenko L.P., Isakov V.V., Zvyagintseva T.N., Likhoshvai E.V. (2005) – Polysaccharides of diatoms occurring in Lake Baikal. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41: 185-191.

Al-Widyan M.I., Al-Shyoukh A.O. (2002) – Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresource Technology* 85: 253-256.

Antolin G., Tinaut F.V., Briceno Y. (2002) – Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technology* 83: 111-114.

Armbrust E.V., Chilsom S.W. (1990) – Role of light and the cell cycle on the induction of spermatogenesis in a centric diatom. *Journal of Phycology* 26:470-478.

Benemann J.R., Oswald W.J. (1996) - Systems and economic analysis of microalgae ponds for conversion of CO₂ to biomass. Final Report to the US Department of Energy.

Bouaid A., Martinez M., Aracil J. (2007) – Long storage stability of biodiesel from vegetable and used frying oils. *Fuel* 86: 2596-2602.

Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z., Avissar Y., Richmond A. (1987) – Lipid and biomass production by the halotolerant microalga *Nannochloropsis salina*. *Biomass* 12: 37-47.

Brown M.R., Dunstan G.A., Norwood S.J., Miller K.A. (1996) – Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Phycology* 32: 64-73.

Bunyakiat K., Makmee S., Sawangkeaw R., Ngamprasertsith S. (2006) – Continuous production of biodiesel via transesterification from vegetable oil supercritical methanol. *Energy Fuels* 20: 812-817.

Chisti Y. (2007) - Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.

Chun-Yen C., Kuei-Ling Y., Aisyah R., Duu-Jong L., Jo-Shu C. (2011) - Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresource Technology* 102: 71-81.

Cutignano A., d'Ippolito G., Romano G., Lamari N., Cimino G., Febbraio F., Nucci R., Fontana A. (2006) - Chloroplastic glycolipids fuel aldehyde biosynthesis in the marine diatom *Thalassiosira rotula*. *ChemBioChem* 7: 450-456.

Dayananda C., Sarada R., Bhattacharya S., Ravishankar G.A. (2005) - Effect of media and culture conditions on growth and hydrocarbon production by *Botryococcus braunii*. *Process Biochemistry* 40: 3125-3131.

Delwiche C.F., Palmer J.D. (1997) - The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In *Origins of Algae and Their Plastids*. Ed. D. Bhattacharya 53-86.

d'Ippolito G., Cutignano A., Tucci S., Romano G., Miralto A., Cimino G., Fontana A. (2004) - The role of complex lipids in the synthesis of bioactive aldehydes of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1686: 100-107.

d'Ippolito G., Cutignano A., Briante R., Febbraio F., Cimino G., Fontana A. (2005) - New C16 fatty-acid-based oxylipin pathway in the marine diatom *Thalassiosira rotula*. *Organic and Biomolecular Chemistry* 3: 4065-4070.

Dittmer J.C., Lester R.L. (1964) - A simple, specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *The Journal of Lipid Research* 5: 126-127.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.

Energy Needs, Choices and Possibilities. Scenarios to 2050. Shell International, (2001).

Falciatore A., Bowler C. (2002) - Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annual Review of Plant Biology* 53:109-130.

Falkowski P.G., La Roche J. (1991) - Acclimation to spectral irradiance in algae. *Journal of Phycology* 27: 8-14.

Falkowski P.G., Barber R.T., Smetacek V. (1998) - Biogeochemical controls and feedback on ocean primary production. *Science* 281: 200-206.

Fernandez-Reiriz M.J., Perez-Camacho A., Ferreiro M.J., Blanco J., Planas M., Campos M.J., Labarta U. (1989) - Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83: 17-37.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957) - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.

Fontana A., d'Ippolito G., Cutignano A., Miralto A., Ianora A., Romano G., Cimino G. (2007) - Chemistry of oxylipin pathways in marine diatoms. *Pure and Applied Chemistry* 79: 481-490.

Garcia-Gonzales M., Moreno J., Canavate J.P., Anguis V., Prieto A., Manzano C., Florencio F.J., Guerrero M.G. (2003) - Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain. *Journal of Applied Phycology* 15: 177-184.

Gouveia L., Oliveira A.C. (2009) - Microalgae as raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 269-274.

Granum E., Myklestad S.M. (2002) - A simple combined method for determination of β -1,3-glucan and cell wall polysaccharides in diatoms. *Hydrobiologia* 477: 155-161.

Granum E., Raven J.A., Leegood R.C. (2005) - How do marine diatoms fix 100 billion tones of inorganic carbon every year? *Canadian Journal of Botany* 83: 898-908.

Greenwell H.C., Laurens L.M., Shields R.J., Lovitt R.W., Flynn K.J. (2010) - Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technology challenges. *Journal of the Royal Society Interface* 7: 703-726.

Griffiths M.J., Harrison S.T.L. (2009) - Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology* 21: 493-507.

Guillard R.R.L., Ryther J.H. (1962) - Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology* 8: 229-239.

Guschina I.A., Harwood J.L. (2006) - Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Research* 45: 160-186.

Haas R., Faber T., Green J., Gual M., Huber C., Resch G., Ruijgrok W., Twidell J. (2000) - Promotion strategies for electricity from renewable energy sources in EU countries.

Hamasaki A., Shioji N., Ikuta Y., Hukuda Y., Makita T., Hlrayama K., Matuzaki H., Tukamoto T., Sasaki S. (1994) - Carbon dioxide fixation by microalgal photosynthesis using actual flue gas from a power plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45-46: 799-809.

Haug A., Myklestad S. (1976) - Polysaccharides of marine diatoms with special reference to *Chaetoceros* species. *Marine Biology* 34: 217-222.

Helm M.M. (1990) - Culture of microalgae. *Tapes philippinarum*. *Biologia e sperimentazione*. E.S.A.V. 91-105.

Hu Q. (2004) - Environmental effects on cell composition. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*: 83-93.

Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Michael Seibert M. and Darzins A. (2008) - Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal* 54: 621-639.

IEA Renewables Information, (2003).

Kolber Z., Zehr J., Falwoski P. (1988) - Effects of Growth Irradiance and Nitrogen Limitation on Photosynthetic Energy Conversion in Photosystem II. *Plant Physiology* 88: 923-929.

Kong Q. Li L., Martinez B., Chen P., Ruan R. (2009) – Culture of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in wastewater for biomass feedstock production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160 (1): 40074.

Kundu S.K. (1981) - DEAE-silica gel and DEAE-controlled porous glass as ion exchangers for the isolation of glycolipids. *General Analytical Methods* 72: 174-185.

Latasa M. (1995) – Pigment composition of *Heterocapsa* sp. and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. *Scientia Marina* 59: 25-37.

Lavaud J., Rousseau B., Etienne A.L. (2004) – General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (*Bacillariophyceae*) *Journal of Phycology* 40: 130-137.

Lehmann J. (2007) - A handful of carbon. *Nature* 447: 143-144.

Maeda K., Owada M., Kimura N., Omata K., Karube I. (1995) CO₂ fixation from the flue gas of coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Conversion and Management* 36: 717-720.

Mann D.G. (1993) – Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Hydrobiologia* 260/270: 11-20.

Mata T.M., Martins A.A., caetano N.S. (2010) – Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 217-232.

Matsumoto H., Shioji N., Hamasaki A., Ikuta Y., Fukuda Y., Sato M., Endo N., Tsukamoto T. (1995) Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51-52: 681-692.

McConville M.J., Bacic A., Clarke A.E. (1986) - Structural studies of chrysolaminaran from the ice diatom *Stauroneis amphioxys* (Gregory). *Carbohydrate Research* 153: 330-333.

Mohan D., Pittman C.U., Steele H.P. (2006) – Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. *Energy & Fuels* 20: 848-889.

Molina Grima E., Belarbi E.H., Fernandes F.G.A., Robles M., Chisti Y. (2003) – Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20: 491-515.

Murakami M., Ikenouchi M. (1997) - The biological CO₂ fixation and utilization project by rite (2) - Screening and breeding of microalgae with high capability in fixing CO₂. *Energy Conversion and Management* 38: S493-S497.

Nagase H., Yoshihara K.I., Eguchi K., Okamoto Y., Murasaki S., Yamashita R., Hirata K., Miyamoto K. (2001) - Uptake pathway and continuous removal of nitric oxide from flue gas using microalgae. *Biochemical Engineering Journal* 7: 241-246.

Napolitano G.E. (1994) – The relationship of lipids with light and chlorophyll measurement in freshwater algae and periphyton. *Journal of Phycology* 30: 943-950.

Negoro M., Hamasaki A., Ikuta Y., Makita T., Hirayama K., Suzuki S. (1993) Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas discharged from a boiler. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 39-40: 643-653.

Norton T.A., Melkionian M., Andersen R.A. (1996) – Algal biodiversity. *Phycologia* 35: 308-326.

Olaizola M. (2003) - Microalgal removal of CO₂ from flue gases: changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8: 360-367.

Oswald W.J., Golueke C.G. (1960) - Biological transformation of solar energy. *Advances in Applied Microbiology* 2: 223-262.

Pahl S.L., Lewis D.M., Chen F., King K.D.(2010) - Heterotrophic growth and nutritional aspects of the diatom *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae): effect of some environmental factors. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109: 235-239.

Parsons T.R., Stephens K., Strickland J.D.H. (1961) - On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 18: 1001-1016.

Paul C., Min M., Yifeng C., Liang W., Yecong L., Qin C., Chenguang W., Yiqin W., Xiaoquan W., Yanling C., Shaobo D., Hennessy K., Xiangyang L., Yuhuan L., Yingkuan W., Martinez B., Ruan R. (2009) - Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* 2: 1-30.

Paulsen B.S., Myklestad S. (1978) - Structural studies of the reserve glucan produced by the marine diatom *Skeletonema costatum* (grev.) Cleve. *Carbohydrate Research* 62: 386-388.

Pedroni P.M., Lamenti G., Prosperi G., Ritorto L., Scolla G., Capuano F., Valdiserri M. (2004) - EniTecnologie R&D project on microalgae biofixation of CO₂: outdoor comparative tests of biomass productivity using flue gas CO₂ from a NGCC power plant. Proceedings of the 7th International Conference on Greenhouse Gas Control Technologies.

Peterson C.L., Reece D.L., Thompson J.C., Beck S.M., Chase C. (1996) - Ethyl ester of rapeseed used as a biodiesel fuel – a case study. *Biomass Bioenergy* 10: 331-336.

Renaud S.M., Thinh L.V., Lambrinidis G., Parry D.L. (2002) – Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211: 195-214.

Richmond A., Zou N. (1999) - Efficient utilization of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organism. *Journal of Applied Phycology* 11: 123-127.

Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. (2009) - Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102: 100-112.

Roessler P.G. (1988) - Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 267: 521-528.

Roessler P.G. (1990) - Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. *Journal of Phycology* 26: 393-399.

Scala S., Carels N., Falciatore A., Chiusano M.L., Bowler C. (2002) - Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* and comparison with the genomes of other eukaryotes. *Plant Physiology* 129: 993-1002.

Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. (1998) - A look back at the US department of energy's aquatic species program: biodiesel from algae. US Department of Energy.

Shifrin N.S., Chilsom S.W. (1981) - Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *Journal of Phycology* 17: 374-384.

Silva-Aciares F.R., Riquelme C.E. (2008) - Comparisons of the growth of six diatom species between two configurations of photobioreactors. *Aquacultural Engineering* 38: 26-35.

Singh J., Gu S. (2010) - Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 2596-2610.

Smilde A., Bro R., Geladi P. (2004) - Multi-way analysis with applications in the chemicals. *Wiley*.

Staats N., De Winder B., Stal L.J., Mur L.R. (1999) - Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *European Journal of Phycology* 34: 161-169.

Sukenik A., Carmeli Y. and Berner T. (1989) - Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *Journal of Phycology* 25: 686-692.

Tamiya H. (1957) - Mass culture of algae. *Annual Review of Plant Physiology* 8: 309-334.

Terry K.L. (1982) - Nitrate uptake and assimilation in *Thalassiosira weissflogii* and *Phaeodactylum tricornutum*: interactions with photosynthesis and with the uptake of other ions. *Marine Biology* 69: 21-30.

Tredici M.R. (1999) - Bioreactors, photo, in: Flickinger M.C., Drew S.W. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, bioseparation* 5: 395-419.

Usui N., Ikenouchi M. (1997) - The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE (1) - Highly-effective photobioreactor systems. *Energy Conversion and Management* 38: S487-S492.

Van Den Hoek C., Mann D.G., Johns H.M. (1997) - Algae. An introduction to phycology. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Vaulot D., Olson R.J., Chilsom S.W. (1986) - Light and dark control of the cell cycle in two phytoplankton species. *Experimental Cell Research* 167: 38-52.

Vaulot D., Olson R.J., Merkel S.M., Chilsom S.W. (1987) - Cell cycle response to nutrient starvation in two marine phytoplankton species. *Marine Biology* 95: 625-630.

Verma M.N.; Mehrotra S.; Shukla A.; Mishra B.N. (2010) - Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: a comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology* 9: 1402-1411.

Vonshank A., Torzillo G., Tomaseli L. (1994) - Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibition in outdoor cultures of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology* 6: 31-34.

Voronova E.N., Konyukhov I. V., Kazimirko Y.V., Pogosyan S.I., Rubin A.B. (2009) - Changes in the condition of photosynthetic apparatus of a diatom alga *Thalassiosira weissflogii* during photoadaptation and photodamage. *Russian Journal of Plant Physiology* 56: 753-760.

Wustman B.A., Cretz M.R., Hoagland K.D. (1997) - Extracellular matrix assembly in diatoms (*Bacillariophyceae*): a model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes* and other diatoms. *Plant Physiology* 113: 1059-1069.

You-Chul J., Chul-Woong C., Yeoung-Sang Y. (2005) - Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal* 27: 127-131.

Zhu C.J., Lee Y.K. (1997) - Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology* 9: 189-194.

Zou N., Richmond A. (2000) - Lighth-path length and population density in photoacclimation of *Nannochloropsis*. *Journal of Applied Phycology* 12: 349-354.

Zudaire L., Roy S. (2001) - Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology* 62: 26-34.

<http://www.carbontrust.co.uk/News/presscentre/2008/algae-biofuels-challenge.htm>.

<http://www.solaritaly.enea.it>

brevetto Neotica s.r.l. e M2M Engineering s.r.l. RM2010/A000297

brevetto Neotica s.r.l. e M2M Engineering s.r.l. WO/2011/007250